

**Identifizierung und Charakterisierung
neuer Virulenzfaktoren der Pathogenitätsinsel aus
enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhemina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Andreas U. Kresse

aus Ferntree Gully / AUS

1. Referent: Prof. Dr. K. N. Timmis
2. Referent: Prof. Dr. J. Wehland
eingereicht am: 01.03.1999
Disputation am: 04.06.1999

Scientia hominibus
beneficium esto.

Diese Arbeit ist den Opfern von Infektionskrankheiten gewidmet

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Herrn Prof. Dr. K.N. Timmis, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Ebel, F., Deibel, C., Kresse, A.U., Guzmán, C.A. und Chakraborty, T. Temperature- and Medium-Dependent Secretion of Proteins by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 64(11):4472-4479 (1996).

Kresse, A.U., Schulze, K., Deibel, C., Ebel, F., Rohde, M., Chakraborty, T. und Guzmán, C.A. Pas, a Novel Protein Required for Protein Secretion and Attaching and Effacing Activities of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 180(17):4370-4379 (1998).

Ebel, F., Podzadel, T., Rohde, M., Kresse, A.U., Krämer, S., Deibel, C., Guzmán, C.A. und Chakraborty, T. Initial Binding of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* to Host Cells and Subsequent Induction of Actin Rearrangements Dependent on Filamentous EspA-Containing Surface Appendages. *Molecular Microbiology* 30(1):147-161 (1998).

Tagungsbeiträge

Kresse, A.U., Schulze, K., Deibel, C., Ebel, F., Rohde, M., Chakraborty, T. und Guzmán, C.A.: Pas, ein neuer Virulenzfaktor aus enterohämorrhagischen *Escherichia coli*. (Vortrag) 3. Minisymposium "Mikrobielle Pathogenität", Burg Rothenfels (1998).

Deibel, C., Chakraborty, T., Krämer, S., Kresse, A.U., Guzmán, C.A. und Ebel, F.: Analysis of Secreted Proteins Encoded by the LEE-Region of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. (Poster) DGHM Jahrestagung, Berlin (1998).

ZUSAMMENFASSUNG	A
I. EINLEITUNG	I
1. Globale Situation mikrobieller Infektionen	1
2. Globaler Anstieg der Lebensmittelinfektionen	2
2.1. Demographische Faktoren	3
2.2. Industrie und Technik	3
2.3. Essensgewohnheiten	3
2.4. Reisen und Handel	4
2.5. Neu auftretende Krankheitserreger	4
3. Mikrobielle Pathogenität	4
4. Pathogene <i>Escherichia coli</i>	5
4.1. Shiga Toxin produzierende <i>E. coli</i> (STEC) und enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	5
4.2. Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	5
4.3. Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	6
4.4. Enterotoxigene <i>E. coli</i> (ETEC)	6
4.5. Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAggEC)	6
5. Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	7
5.1. Definition und Serovaren	7
5.2. Durch EHEC verursachte Krankheitsbilder	7
5.3. Epidemiologie	8
5.4. Immunantwort	9
5.5. Diagnostik, Kontrolle und Prävention	10
5.6. Eigenschaften von EHEC	11
6. Ziele dieser Arbeit	22
II. MATERIAL UND METHODEN	23
1. Bakterienstämme, Plasmide und eukaryontische Zelllinien	23
1.1. Bakterienstämme	23
1.2. Plasmide	24
1.3. Eukaryontische Zellen	25
2. Chemikalien, Enzyme und andere Materialien	25
2.1. Chemikalien	25
2.2. Membranen	27
2.3. Enzyme	27
2.4. Kommerzielle Kits	28
2.5. Kommerzielle Antikörper und Seren	28
2.6. Nicht-kommerzielle Antikörper und Seren	29
2.7. Oligonukleotide	29
3. Nährmedien, Supplemente, Lösungen und Puffer	30
3.1. Nährmedien für Bakterien	30

3.2. Nährmedien für eukaryontische Zellen	32
3.3. Selektionsmarker	32
3.4. Lösungen und Puffer	32
4. Kultivierung und Lagerung von Zellen	33
4.1. Kultivierung und Stammkonservierung von Bakterien	33
4.2. Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen	34
5. Bakterientypisierung	35
6. Arbeiten mit Bakterien und Zellkulturen	35
6.1. Infektion von Zellkulturen	35
7. Arbeiten mit Proteinen	38
7.1. Gesamtzellextrakt	38
7.2. Zellaufschluß mittels French Press	38
7.3. Fraktionierungen	38
7.4. Sekretierte Proteine	40
7.5. Methanol-Fällung von Proteinen	40
7.6. Isolierung von His-Tag-Fusionsproteinen	40
7.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	41
7.8. Nachweis von Proteinen	41
7.9. Protein-Protein-Interaktion	44
7.10. Protein-DNA-Interaktion	45
7.11. Kopplung von Proteinen an Latexbeads	46
8. Arbeiten mit Antikörpern	46
8.1. Herstellung polyklonaler Antikörper	46
8.2. Aufreinigung polyklonaler Antikörper	47
8.3. Konzentrationsbestimmung von Antikörpern mittels ELISA	47
9. Arbeiten mit DNA	48
9.1. Isolierung und Aufreinigung von DNA	48
9.2. Analyse von DNA-Präparationen	50
9.3. Isolierung von DNA-Fragmenten	52
9.4. Modifizierung von DNA	52
9.5. Transfer von DNA in Bakterien	52
9.6. Polymerase-Chain Reaction (PCR)	54
9.7. Unidirektionale Verkürzung durch ExoIII-Verdau	56
9.8. DNA-Sequenzierung mittels Dye Terminator Cycle Sequencing	57
9.9. Southern Blot Analyse	58
10. Arbeiten mit RNA	61
10.1. Isolierung und Aufreinigung von RNA	61
10.2. Analyse von RNA-Präparationen	62
10.3. Northern Blot Analyse	63
10.4. Bestimmung des Transkriptionsstarts	65
11. Datenverarbeitung	66

III. ERGEBNISSE.....	68
1. Optimierung der Infektionsbedingungen	68
1.1. Wahl der Zelllinie und 'Aktivierung' von EHEC.....	68
1.2. Invasivität von EHEC EDL933 und Einfluss von FCS auf die Invasion.....	70
2. Charakterisierung von <i>espB</i>	73
2.1. Klonierung und Sequenzierung von <i>espB</i> aus STEC.....	74
2.2. Überexpression eines His ⁻ -EspB _{EDL933} -Fusionproduktes	77
3. Klonierung und Sequenzierung der LEE-Sequenz zwischen <i>eaeA</i> und <i>espB</i> aus EHEC EDL933	78
3.1. PCR-Amplifikation der IR _{EDL933} -Sequenz	78
3.2. Unidirektionale Verkürzung und Sequenzierung von IR _{EDL933}	79
3.3. Sequenzvergleich der in IR _{EDL933} kodierten Aminosäuresequenzen	83
4. Charakterisierung von EspA	85
4.1. Sequenzanalyse von <i>espA</i> _{EDL933}	85
4.2. Konstruktion einer in-frame Deletionsmutante von <i>espA</i> _{EDL933}	86
4.3. Analyse der sekretierten Proteine von EDL933 Δ <i>espA</i>	88
4.4. Adhärenz und Invasivität von EHEC EDL933 Δ <i>espA</i>	88
4.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 Δ <i>espA</i> -infizierten HeLa-Zellen.....	89
4.6. Elektronenmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 Δ <i>espA</i> -infizierten HeLa-Zellen: Charakterisierung von surface appendages	91
4.7. Nachweis von EspA-Filamenten	94
5. Charakterisierung von EspD	101
5.1. Sequenzanalyse von <i>espD</i> _{EDL933}	101
5.2. Konstruktion einer in-frame Deletionsmutante von <i>espD</i> _{EDL933}	101
5.3. Analyse sekretierter Proteine von EHEC EDL933 Δ <i>espD</i>	103
5.4. Adhärenz und Invasivität der Δ <i>espD</i> _{EDL933} -Mutante	104
5.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 Δ <i>espD</i>	105
5.6. Analyse des Aggregationsverhaltens von EHEC EDL933 Δ <i>espD</i>	107
5.7. Lokalisation von EspD _{EDL933} während der Infektion von EHEC EDL933 an HeLa-Zellen.	111
6. Charakterisierung von SepL.....	114
6.1. Sequenzanalyse von <i>sepL</i> _{EDL933}	114
6.2. Konstruktion einer in-frame Deletionsmutante von <i>sepL</i> _{EDL933}	118
6.3. Analyse sekretierter Proteine von EDL933 Δ <i>sepL</i>	119
6.4. Adhärenz der Δ <i>sepL</i> _{EDL933} -Mutante.....	121
6.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von EDL933 Δ <i>sepL</i>	122
6.6. Elektronenmikroskopische Analyse von EDL933 Δ <i>sepL</i>	123
6.7. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen SepL _{EDL933}	124
6.8. Lokalisation von SepL _{EDL933}	125
6.9. SepL _{EDL933} -Protein-Bindungsverhalten.....	127
6.10. DNA-Bindungsverhalten von SepL _{EDL933}	128

7. Charakterisierung von Pas.....	130
7.1. Sequenzanalyse von <i>pas</i> _{EDL933}	130
7.2. Konstruktion einer in-frame Deletionsmutante von <i>pas</i> _{EDL933} und Analyse der sekretierten Proteine von EHEC EDL933 Δ <i>pas</i>	132
7.3. Adhärenz und Invasivität der Δ <i>pas</i> _{EDL933} -Mutante.....	134
7.4. ... Elektronenmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 Δ <i>pas</i> -infizierten HeLa-Zellen	134
7.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 Δ <i>pas</i>	136
7.6. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Pas _{EDL933}	137
7.7. Lokalisation von Pas _{EDL933}	139
7.8. Pas _{EDL933} -Protein-Bindungsverhalten.....	140
8. Bindungsstudien mit Latex Beads.....	142
8.1. Überexpression und Aufreinigung von Esp-Proteinen für die Kopplung an Latex Beads	142
8.2. Interaktionen von HeLa-Zellen mit gekoppelten Latex Beads.....	143
9. Transkriptionelle Organisation von IR _{EDL933}	144
9.1. Bestimmung der Transkriptionseinheiten mittels Northern Blot.....	144
9.2. Bestimmung des Transkriptionsstarts des <i>esp</i> -Operons.....	146
9.3. β -Galaktosidase-Studien.....	149
IV. DISKUSSION.....	154
1. Locus of enterocyte effacement.....	154
2. Charakterisierung von EspB aus EHEC.....	155
3. Pas ist eine Komponente des Typ III Sekretionsapparates.....	160
4. SepL: ein bifunktionales Protein des Typ III Sekretionssystems?.....	162
5. EspA ist die Hauptkomponente eines Typ III Sekretionssystem-abhängigen Translokationsapparates für Effektoren.....	166
6. EspD wird in die Wirtszellmembran inseriert und fungiert möglicherweise als Translokator für Effektorproteine.....	168
7. Genetische Organisation und Regulation der IR _{EDL933}	171
8. Schlussfolgerung: ein neues 4-Stufen-Modell für Infektionen von Epithelzellen mit EHEC.....	174
9. Aussichten: Bekämpfung von EHEC-Infektionen.....	175
REFERENZEN.....	177
ANHANG.....	192
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	I
TABELLENVERZEICHNIS.....	i

Zusammenfassung

Enterohämorrhagische *Escherichiacoli* (EHEC) sind hochkontagiöse zoonotische Pathogene, die schwere blutige Durchfälle, das hämolytisch-urämisches Syndrom und andere Erkrankungen hervorrufen können. Sie werden in die Gruppe der Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC) eingeordnet, wobei unter EHEC jene STEC zu verstehen sind, die nachgewiesen humanpathogen sind. Prophylaktisch sollten allerdings alle STEC als humanpathogen betrachtet werden. EHEC wurden weltweit in den Ausscheidungen vieler verschiedener Tiere wie beispielsweise Ziegen, Schafe, Hunde oder Vögel nachgewiesen. Das Infektionsrisiko für den Menschen liegt jedoch vorwiegend in dem Verzehr kontaminierter Lebensmittel aus Rindern, da bei bis zu 80% der Bestände STEC nachgewiesen werden konnten. Ungenügend gegartes Fleisch, Milch und Milchprodukte, aber auch gedüngte Produkte wie z.B. Salat bilden oftmals die Quellen neuer Infektionen. Wegen der sehr geringen Infektionsdosis (10-100 CFU) besteht die Gefahr von Schmierinfektionen und großflächiger Ausbrüche. EHEC-Infektionen sind bislang nicht intervenierbar, da die Vergabe von Antibiotika wegen des Risikos schwerer Folgekomplikationen nicht angezeigt ist, und als Impfstoff gegen EHEC wird bislang nur serotypisches LPS getestet.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung neuer Virulenzfaktoren aus EHEC EDL933, der als Referenzstamm humanpathogener STEC gilt. EHEC EDL933 gehört zum Serotyp O157, der in Europa und den USA als der häufigste Verursacher von EHEC-Infektionen beschrieben wurde und der durch die Expression von Shiga Toxin (STx) 1 und STx2 als besonders virulent einzustufen ist. Die EHEC-Infektion an Epithelzellen ist histopathologisch vergleichbar mit der Infektion durch enteropathogene *E. coli* (EPEC) und führt zur engen Anhaftung der Bakterien an die eukaryontischen Zellen, Reorganisation des Cytoskelets unter der Bildung erhabener Strukturen (*pedestals*), auf denen die Bakterien aufgelagert sind, und zur Zerstörung der Mikrovilli, was zusammengefasst als *attaching and effacing* (A/E) bezeichnet wird. Die genetische Grundlage des A/E bildet die chromosomal inserierte Pathogenitätsinsel LEE (*Locus of enterocyte effacement*). Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Gene der LEE aus EPEC bekannt (*sepA-D*, *eaeA*, *espB*); für EHEC war nur *eaeA*, das Gen für das Adhäsin Intimin, publiziert. Die Klonierung von *espB* aus EHEC bot einen Ansatz, neue Virulenzfaktoren, die auch in EPEC unbekannt, etwa 4,4 kb großen Sequenzbereiches zwischen *eaeA* und *espB* zu identifizieren.

1. Die Pathogenitätsinsel LEE aus EHEC enthält in der Sequenz zwischen *eaeA* und *espB* vier weitere Gene: *pas*, *sepL*, *espA* und *espD*. Die Translationsprodukte aller Gene einschließlich *espB* wurden mittels immunchemischer Methoden nachgewiesen und durch die fehlende Expression in Deletionsmutanten (außer *espB*) bestätigt.

2. Die Klonierung, Sequenzierung und Analyse des *espB*-Gens zeigte, dass EspB aus EHEC, STEC und EPEC mit 77 bis 82% Similarität homolog sind. Allerdings enthalten die Sequenzen aus STEC und EHEC ein weniger stark ausgeprägtes Serin- und Threonin-reiches Motiv im N-Terminus sowie deletierte Bereiche im C-Terminus, was möglicherweise für die berichtete

Verstärkung der Invasivität durch die Verfügbarkeit von EspB aus EPEC verantwortlich ist. EspB wurde von anderen Autoren als ein in die eukaryontische Wirtszellmembran inseriertes Protein beschrieben. Studien mit aufgereinigtem EspB aus EHEC EDL933 zeigten, dass EspB per se nicht in der Lage ist, in die Cytoplasmamembran zu integrieren, sondern es bedarf wahrscheinlich zusätzlicher Faktoren des Typ III Sekretionssystems bzw. seiner Zielproteine.

3. Die Analyse von *espD* und seines Translationsproduktes zeigte, dass EspD während der Infektion mit EHEC EDL933 ähnlich wie EspB in die Cytoplasmamembran der eukaryontischen Wirtszelle inseriert wird. Die Charakterisierung einer *in-frame* Deletionsmutante von *espD* aus EHEC EDL933 wies die Notwendigkeit dieses Proteins für den Pathogenitätsprozess von EHEC auf, da keine Aktinakkumulation erfolgte und keine enge Bindung der Bakterien an die Wirtszellen möglich war. Allerdings wurde eine leichte Adhäsivität beibehalten, was auf die Erhaltung adhäsiver Faktoren für die Initialbindung an Epithelzellen hindeutet, während die feste Intimin-Bindung unterbunden ist. Tatsächlich konnte EspA als eine Komponente unstrukturierter Proteinaggregationen auf der Oberfläche der *espD*-Mutanten nachgewiesen werden, was die Bedeutung von EspD in der Produktion von EspA-Filamenten (s. 4.) deutlich macht. Es wurde die Hypothese widerlegt, dass EspD eine Komponente der EspA-Filamente sein könnte. Eine Komplementation der *espD*-Mutante stellte den Phänotyp des Wildtyps wieder her, da die Bildung von Mikrokolonien, Aktinakkumulation und Filamentbildung nachgewiesen werden konnten. Die hergestellte Mutante konnte so als unpolar bestätigt werden.

4. EspA wurde als Hauptkomponente eines adhäsiven Pilus-artigen Filaments auf der Oberfläche der Bakterien nachgewiesen. Diese Filamente etablieren interbakterielle Kontakte und Kontakte zu eukaryontischen Zellen. Eine hergestellte *in-frame* Deletionsmutante deckte die absolute Notwendigkeit dieses Proteins zur leichten und zur festen Bindung von EHEC EDL933 an Epithelzellen auf. Die EspA-Filamente genannten Oberflächenstrukturen vermitteln demnach in EHEC die initiale Bindung an die Wirtszellen, was sich von der Situation in EPEC darin unterscheidet, dass in EPEC die *bundleforming pili* diese adhäsive Funktion maskieren können. Bindungsstudien mit aufgereinigtem EspA ließen jedoch keine klare Aussage über diese Kapazität des EspA-Proteins zu, was entweder ein Resultat der schwachen Bindung ist, oder EspA selbst besitzt keine Bindungseigenschaft für epitheliale Zellen, sondern die EspA-Filamente enthalten möglicherweise adhäsive *tip*-Proteine. Die Aufklärung der Bedeutung von EspA in dem Pathogenitätsprozess von EHEC lieferte die Grundlage für ein neues Infektionsmodell (s. 8.).

5. SepL nach Fraktionierung von EHEC EDL933 sowohl in der Fraktion des Cytoplasmas als auch in den Fraktionen der äußeren Membran sowie in geringerer Menge der inneren Membran nachgewiesen worden. Auf Grund von Sequenzanalysen wird allerdings davon ausgegangen, dass SepL kein integrales Protein ist, sondern membran-assoziiert vorliegt oder ein Ligand des Typ III Sekretionsapparates ist. SepL besitzt proteinbindende Eigenschaften und bindet an ein über 90 kDa großes sekretiertes Protein. Darüberhinaus enthält die Aminosäuresequenz von SepL putative Domänen, die für eine Multimerisierung und möglicherweise auch für eine DNA-bindende Funktion verantwortlich sein könnten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass SepL

die Sekretion eines unbekannten 54 kDa großen Proteins verhindert und dass das Fehlen von SepL zur Sekretion verkürzter EspE-Fragmente führt, was durch eine fehlende Chaperon (OrfU)-Aktivität für EspE erklärt werden könnte. Eine *in-frame* Deletionsmutante von *sepL* sekretierte nur sehr geringe Mengen von EspA, EspB und EspD, jedoch EspE vergleichbar wie der Wildtypstamm, was die Bedeutung von SepL als essentielle Komponente des Typ III Sekretionssystems ausschloss. Durch eine Komplementation der *sepL*-Mutante wurden die Sekretionseigenschaften wiederhergestellt. Diese sind Hinweise auf eine mögliche regulatorische Rolle von SepL. DNA-Bindungsstudien zeigten jedoch, dass aufgereinigtes SepL allein nicht an die DNA-Sequenz zwischen *eaeA* und *espB* bindet. Neben der Möglichkeit anderer Bindungsstellen im LEE könnte SepL nur als Heteromer aktiv sein, als Fusionsprotein oder unter den gewählten Bedingungen inaktiv sein, oder die Rolle von SepL in der Regulation liegt in der indirekten Feinregulierung der Virulenzkaskade, indem es andere Regulatoren beeinflusst. Mittels aufgereinigtem SepL generierte Antikörper dienten zur Lokalisation des Proteins. SepL liegt in der äußeren Membran exponiert vor, was in Analogie zu YopN aus *Yersinia* auf eine Sensor-Funktion des Proteinsschließen lassen könnte.

6. Pas wurde als eine Komponente des Typ III Sekretionssystems von EHEC identifiziert. Das Vorliegen von Pas ist essentiell für die Sekretion der Proteine EspA, EspB, EspD und EspE. Mittels aufgereinigtem Pas generierte Antikörper dienten zur Aufklärung der Lokalisation von Pas in der inneren Membran, was durch die Detektion einer in Permeasen konservierten Transmembrandomäne unterstützt wurde. Das Vorliegen modifizierter Formen, deren Charakter wahrscheinlich Myristoylierungen sind, und bindende Eigenschaften an sekretierte Proteine - wobei aufgereinigtes Pas und Pas der cytoplasmatischen Fraktion diese Eigenschaft besaßen, Pas der inneren Membran hingegen nicht - lassen den Schluß zu, dass Pas möglicherweise einen alternierenden Zyklus aus Bindung von Zielproteinen für die Sekretion und Abgabe der Zielproteine an das Typ III Sekretionssystem an der inneren Membran unterläuft.

7. Die genetische Organisation des Bereiches zwischen *eaeA* und *espB* wurde mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen, 5'-RACE-Experimenten und Primer Extension Analysen aufgeklärt. So bilden *pas* und *sepL* monocistronische Operatoren. Die Gene *espA*, *espD* und *espB* bilden ein Operon, dem keine weitere Einheit downstream von *espB* angehört. Die Regulation von *espB* ist unter den gewählten Bedingungen vom Promotor des *esp*-Operons abhängig, was die Theorie einer monocistronischen Transkription widerlegt. Durch β -Galaktosidase-Reporter Experimente wurde gezeigt, dass die Expression des *esp*-Operons durch den Kontakt mit eukaryontischen Zellen, durch Bedingungen, die denen des Gastrointestinalsystems ähneln, und durch das Megaplasmid stimuliert wird.

8. Nach den Erkenntnissen über die sekretierten Proteine EspA, EspB und EspD ließ sich ein an die vorgeschlagenen Modelle für EPEC-Infektionen angelehntes neues 4-Stufen-Modell der Infektion von Epithelzellen mit EHEC erstellen, das das Problem der Initialbindung sowie der Bildung von Mikrokolonien ohne das Vorhandensein von *bundle forming pili* in EHEC behebt und gleichzeitig aufweist, dass die über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleusten Proteine nicht in das Medium abgegeben werden, sondern eine gerichtete Translokation über die EspA-

Filamente in die Wirtszelle erfahren. EspB und EspD bilden nach dieser Hypothese einen Translokator-Komplex in der Cytoplasmamembran der Wirtszelle.

Die Analyse des zwischen *eaeA* und *espB* situierten Sequenzabschnitts zeigte, dass alle darin enthaltenen Gene für den Pathogenitätsprozess von EHEC essentielle Virulenzfaktoren kodieren, die in einem frühen Stadium der Infektion von Bedeutung sind. Zwei dieser Faktoren, EspA und SepL, sind exponierte Oberflächenproteine, die in den Experimenten mit ganzen Zellen durch spezifische Antikörper zugänglich waren. SepL ist überdies in verschiedenen EPEC- und EHEC-Stämmen hochkonserviert, und es darf angenommen werden, dass dies eine konservierte Funktion von SepL im A/E-Prozess widerspiegelt, so dass SepL möglicherweise auch in weitverwandten A/E-auslösenden Bakterien, die den LEE enthalten, konserviert vorliegt. EspA und SepL bieten sich somit als potentielle Antigene für die Immunisierung an, die möglicherweise über die Gruppe pathogener A/E- *E. coli* (EHEC, STEC, EPEC, diffus adhärierende *E. coli*, kaninchen-pathogene *E. coli*) hinaus auch vor anderen A/E-Bakterien (*Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*) einen Immunschutz induzieren könnten.

I. EINLEITUNG

1. Globale Situation mikrobieller Infektionen

Bis vor kurzer Zeit erschien es, dass eine globale Kontrolle über Infektionskrankheiten durchführbar sei. Viele Krankheiten wählte man nahe der Ausrottung, wie es für die Pocken erreicht worden ist. Aber die Zahl der Infektionen durch intensiv bekämpfte Erreger hat wieder zugenommen. So zählt die Malaria weiterhin zu den Infektionen mit den häufigsten Todesfällen. Und auch der weltweite "Rückfall" durch Tuberkulose stellt ein großes gesundheitliches Gefährdungspotential dar – nicht nur für Entwicklungsländer, sondern auch für Industrieländer, deren Bewohner unter exzellenten hygienischen und soziologischen Bedingungen leben. Insgesamt beruhen etwa 1/3 der Todesfälle weltweit auf Auswirkungen von Infektionskrankheiten (s. Abb. 1). Dabei nehmen Infektionen, die von Person zu Person übertragen werden, eine bedeutende Stellung ein, gefolgt von Lebensmittel-, Wasser- und Bodenkontaminationen (s. Abb. 1). Werden die Infektionskrankheiten symptomatisch aufgegliedert, so läßt sich das Ausmaß von Atemwegs- und Durchfallerkrankungen, Tuberkulose, Malaria und anderer Infektionen für die Mortalität messen (s. Abb. 2).

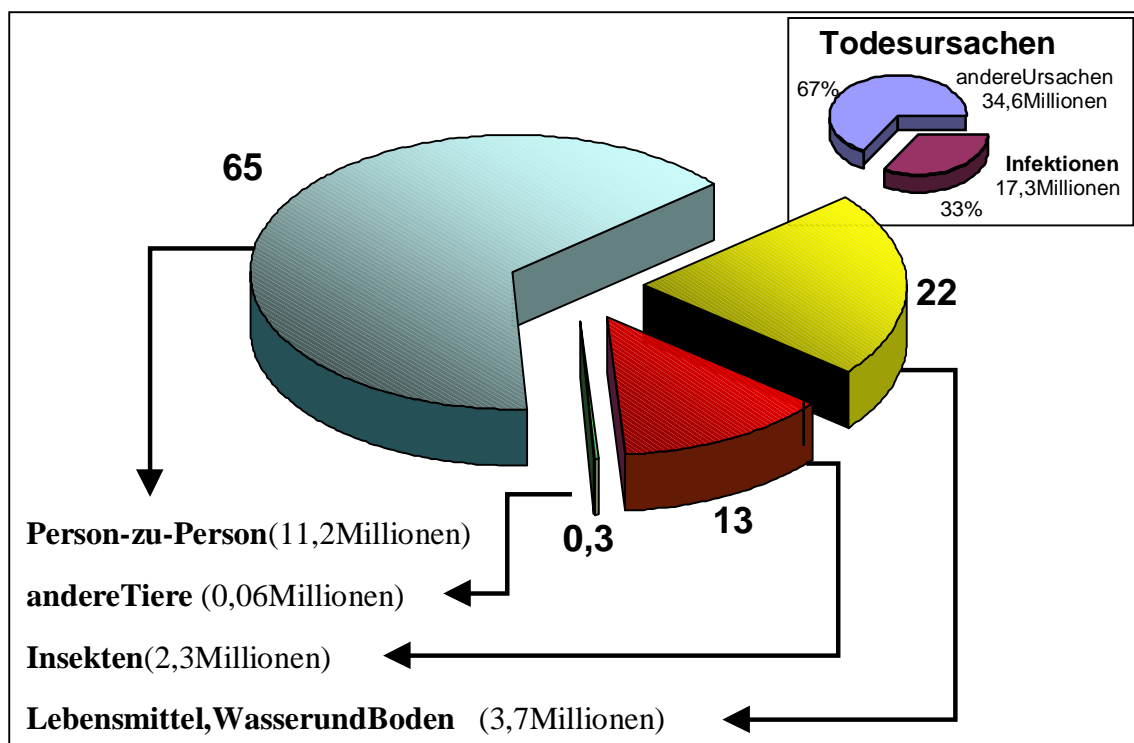


Abb. 1: Todesursachen und Aufteilung der Infektionskrankheiten weltweit. Die Daten wurden dem Bericht der WHO, (WHO, 1996b), S. 23 entnommen.

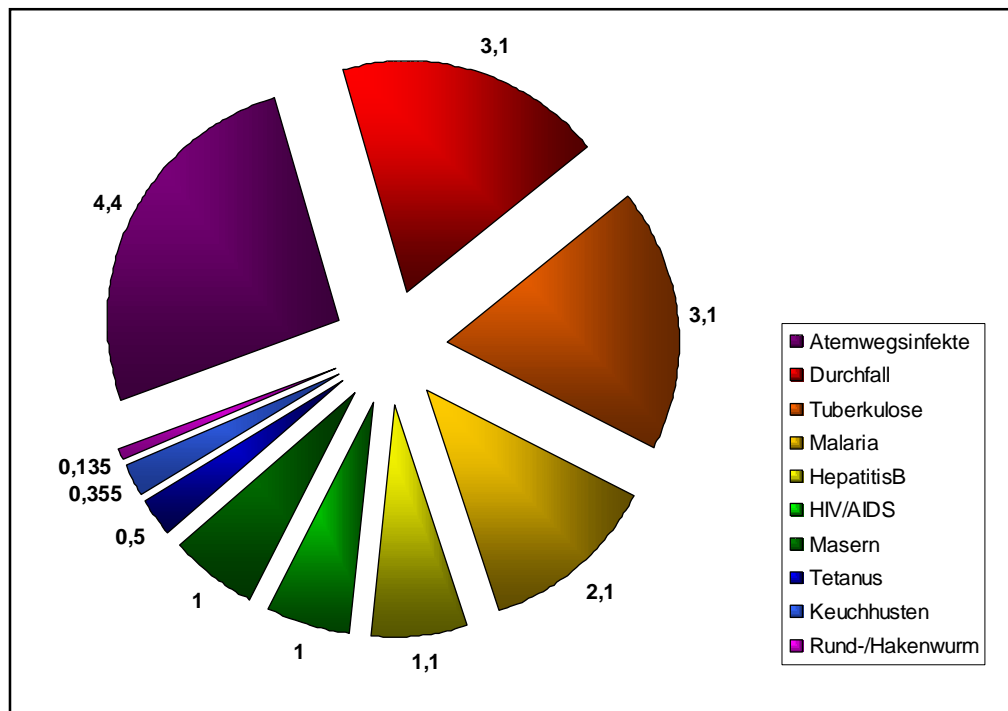


Abb.2: Todesfälle durch Infektionskrankheiten – die 10 häufigsten Ursachen. Die Daten wurden dem Bericht der WHO, (WHO, 1996b), S. 24 entnommen. Die Zahlen geben die Häufigkeit der Todesfälle in Millionen an.

Ein besonderes Problem im Kampf gegen Infektionskrankheiten stellt die wachsende Ohnmacht vor Antibiotika-resistenten Spezies und vor neu auftretenden Erregern dar. Die Verwendung von Antibiotika als Therapie bei Menschen oder prophylaktisch bei Tiermasthaltungen legt einen gerichteten Selektionsdruck auf das Überleben von Bakterienstämmen. Beispielsweise ist der Anteil Antibiotika-resistenter *Salmonella*-Stämme bei Infektionen in den USA von 17% Ende der 70er Jahre auf 31% Ende der 80er Jahre gestiegen (Lee et al. 1994). Eine Folge hiervon ist die erhöhte Hospitalisierung erschwerter Fälle durch Infektionen mit Antibiotika-resistenten Stämmen (Lee et al. 1994). Zunehmend entstehen auch mehrfach-resistente Bakterienstämme, wie z.B. *Salmonella typhimurium* DT104, der durch seine Resistenz gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamiden und Tetracyclin erhebliche Schwierigkeiten bei der Behandlung der Patienten bereitet.

2. Globaler Anstieg der Lebensmittelinfektionen

In einer Presseveröffentlichung der WHO vom 13.08.1997 wurde berichtet, dass die tatsächliche Zahl der Lebensmittelinfektionen um etwa 350fach höher eingeschätzt wird als die erfassten Fälle indizieren (WHO, 1997a). Besonders erschreckend sind die in Entwicklungsländern bei Kindern unter 5 Jahren durch kontaminierte Lebensmittel hervorgerufenen 1.5 Milliarden Fälle von Durchfallerkrankungen mit über 3 Millionen Todesfällen. Verursacher sind hierfür vor allem Cholera, Campylobacteriose, *E. coli*-Infektionen, Salmonellose, Shigellose, Brucellose und Hepatitis A. Aber auch die industrialisierte Welt verzeichnet trotz sehr guter Wasserversorgung,

hygienischen Bedingungen und Verwendung hoher Technologiestandards zur Reinhaltung der Lebensmittel einen stetigen Anstieg nahrungsbedingter Infektionen (WHO, 1997a).

Lebensmittelinfektionen bedingen überdies hohe ökonomische Kosten, wie aus einer Statistik für die USA ersichtlich wird, wonach 7 Pathogene (*Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* und *Toxoplasma gondii*) für jährlich etwa 3.3-12.3 Millionen Fälle mit bis zu 3900 Todesfällen verantwortlich sind. Die Folgekosten dieser Infektionen belaufen sich demnach auf jährlich 6.5-34.9 Milliarden \$US (WHO, 1997a).

2.1. Demographische Faktoren

Die Anzahl infektionsanfälliger Personen innerhalb der Industriestaaten nimmt stetig zu (Altekruse et al. 1997). Dies begründet sich durch den wachsenden Anteil der Bevölkerung an immunokomprimierten Personen, was aus der steigenden Zahl älterer Menschen, HIV-Infizierter und chronisch Erkrankter folgt. Zudem ermöglichen die medizinischen Erfolge vielen Menschen eine erhöhte Überlebensrate, z.B. durch neue Krebstherapien, aber dies geschieht oftmals auf Kosten einer eingeschränkten Gesundheitlichen Verfassung.

2.2. Industrie und Technik

Die gewachsene Massenproduktion und die weitere räumliche Verteilung von Lebensmitteln birgt die Gefahr quantitativ und geographisch größerer Ausbrüche. So führte 1985 in den USA die Kontamination von pasteurisierter Milch mit *Salmonella* zu einer Infektion von etwa 250.000 Personen (Ryan et al. 1987). Die Massenproduktion führt zu der Notwendigkeit einer verstärkten Kontrolle und u.U. zu kostspieligen Rückrufen kontaminierter Lebensmittel, z.B. als 1997 in der bislang größten Rückrufaktion von Lebensmitteln 10.000 Tonnen rohe gefrorene Hamburger wegen des Verdachts auf eine Kontamination mit EHEC O157 vernichtet wurden (MMWR, 1997).

2.3. Essensgewohnheiten

Absurderweise geht mit dem um 50% erhöhten Verbrauch an Gemüse und Obst zwischen 1974 und 1994 auch ein erhöhtes Risiko an Lebensmittelinfektionen einher (Altekruse et al. 1997). Infektiöse Ausbrüche resultierten zuweilen aus dem Verzehr frischer Produkte, die durch Düngung oder unsachgemäße Handhabung kontaminiert waren, so durch Salat, gekochtem Mais, Joghurt oder Käse (WHO, 1996a). Auch *Fast Food* Ketten sind häufig Infektionsquellen, wobei ungenügend gegartes Fleisch die häufigste Ursache von Infektionen darstellt (Bockemuhl und Karch, 1996). Registrierte Ausbrüche durch Lebensmittelinfektionen in den USA innerhalb der 90er Jahre gingen mit beinahe 80% zu Lasten von auswärtigem Essen (Bean et al. 1996). Unsachgemäße und unhygienische Handhabung der Lebensmittel betreffen, insbesondere in Restaurantketten, oft gleich mehrere Personen, aber auch das Unwissen einzelner Personen über die fachgerechte Handhabung von Lebensmitteln ist zu beklagen, da besonders Kinder zunehmend unaufgeklärt bleiben (Manchester und Clauson, 1995; Collins et al. 1995).

2.4. Reisen und Handel

Die globale Beweglichkeit einer steigenden Anzahl von Personen hat in diesem Jahrhundert kontinuierlich und drastisch zugenommen. Reisende werden mit vielen ihrem Immunsystem unbekannten Pathogenen konfrontiert. Es besteht somit zum einen das persönliche Risiko einer Erkrankung, zum anderen auch die Verschleppung der Pathogene in das Heimatland, besonders da viele Erkrankungen erst mehrere Tage nach der Infektion symptomatisch werden (Finelli et al. 1992; Eberhart-Phillips et al. 1996). Aber auch der weltweite Transport der Lebensmittel oder anderer Güter per se beinhaltet das Risiko der Verbreitung pathogener Keime (Taylor et al. 1993).

2.5. Neuauftretende Krankheitserreger

Mehr als 30 neue Krankheitserreger wurden von der WHO innerhalb der letzten 20 Jahren registriert. Darunter gehören so bekannte wie HIV, von dem vor 15 Jahren kaum jemand etwas wußte und das heutzutage mit etwa 20 Millionen Erwachsenen weltweit lebensbedrohliche Ausmaße annimmt; neue Typen des Hepatitis B Virus, deren Verbreitung die Zahl von 2 Milliarden infizierter Personen erreicht hat; oder Ebola, dessen hämorrhagisches Fieber innerhalb weniger Tage 80% der Infizierten sterben läßt. Auch eine neue Protozoe der Gattung *Cryptosporidium* hat für mehrere Ausbrüche gesorgt.

Es wurden darüber hinaus neue bakterielle Krankheitserreger registriert, so z.B. neue Varianten altbekannter Stämme wie *Vibrio cholerae* (Serotyp O139) oder *Escherichia coli*. Enterohämorrhagische *E. coli* stellen durch ihre ubiquitäre Erscheinung, ihre hohe Infektiosität und das durch sie verursachte Krankheitsbild ein ernstzunehmendes weltweites Gefährdungspotential dar, dessen Ausmaß sich bislang nur für einige Länder abschätzen läßt.

3. Mikrobielle Pathogenität

Die Fähigkeit einer Spezies von Mikroorganismen, in einem Makroorganismus Krankheit zu erzeugen, nennt man mikrobielle Pathogenität (modifiziert nach Hahn et al. 1994).

Das Leben von Makroorganismen ist ohne die Existenz der Mikroorganismen nicht zu denken. Jegliche Prozesse von Produktion über Konsumierung bis zur Mineralisation gehören zum Repertoire mikrobiologischer Potentials. Das Leben des evolutiv am höchsten entwickelten Lebewesens dieser Erde ist trotz der fortgeschrittenen Kontrolle über viele Bereiche der Natur doch grundlegend verwurzelt mit den niedrigsten Lebensformen.

Das menschliche Leben beginnt in einer hochsicheren Umgebung, in der Bedingungen wie Temperatur und Ernährung optimal gehalten werden. Der Fötus entwickelt sich in einem sterilen Bereich, der weitgehend vor Mikroben geschützt ist. Lediglich eine mütterliche Infektion mit Pathogenen wie Cytomegalovirus, Rubella Virus oder *Toxoplasma* können das Ungeborene transplazental infizieren. Aber die normalerweise sterile Situation kommt zu einem plötzlichen jedoch natürlichen Abbruch, wenn das Kind während der Geburt mit der mütterlichen Vaginalflora und anschließend den Organismen der Umwelt in Berührung kommt. Tatsächlich werden ab dem Zeitpunkt der Geburt die kindliche Oberfläche, Oropharynx, gastrointestinale und andere Schleimhäute kontinuierlich von Mikroorganismen besiedelt. Die Zusammensetzung

der mikrobiellen Gemeinschaft kann sich im Laufe des Lebens ändern, abhängig vom individuellen Zustand einer Person, wie z.B. Stabilität des Immunsystems, Ernährungsweise, Handhabung von Hygienemaßnahmen oder die Einnahme von Antibiotika. Allerdings dürfen viele Mikroorganismen der menschlichen Flora als nutzbringend betrachtet werden, da sie Vitamine synthetisieren (z.B. Biotin, Pantothersäure, Pyridoxin, Riboflavin und Vitamin K), Nahrung in wertvolle Substanzen umsetzen oder durch proteolytische Enzyme die wirtseigenen Faktoren zur Verwertung der Nahrung unterstützen. Nicht zuletzt stabilisieren diese Organismen die normale Darmflora und verhindern eine initiale Kolonisierung potentieller Pathogene. Es gibt nur wenige Mikroorganismen der physiologischen Kolonisationsflora, die nicht in der Lage sind, im Menschen Krankheiten zu verursachen. Hierzu gehören die Lactobacillen der Döderlein'schen Vaginalflora. Aber selbst Mikroorganismen, von denen bekannt ist, dass sie schwere Erkrankungen hervorrufen können, sind natürliche Bewohner der menschlichen Haut oder Schleimhäute. *Escherichia coli* beispielsweise ist ein gewöhnlicher Kommensale des Gastrointestinalsystems. Aber im Falle einer Sepsis, Meningitis oder nosokomialer Pneumonie kann dieser eigentlich wertvolle Mikroorganismus lebensbedrohliche Komplikationen auslösen. Die Lipopolysaccharide (Endotoxine) stellen dabei den Hauptfaktor der Erkrankung dar, indem sie Fieber, Komplementaktivierung, hypotonen Schock und Verbrauchskoagulopathie verursachen. Andere Beispiele sind Enterokokken, *Enterobacter* und *Bacteroides fragilis*. Solche Organismen werden als fakultativ pathogen (Opportunisten) bezeichnet und entfalten ihre potentielle Virulenz nur unter für den Wirtsorganismus ungünstigen Umständen. Davon heben sich die obligat pathogenen Organismen ab, die ungeachtet der individuellen Verfassung des Wirtes klinisch signifikante Krankheiten auslösen. Hierzu gehören u.a. *Bacillus anthracis*, β -hämolisierende Streptokokken, *Neisseria gonorrhoeae*, Salmonellen, Shigellen, *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*.

4. Pathogene *Escherichia coli*

Die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehörende Gattung *E. coli* beinhaltet neben den zur physiologischen Darmflora gehörenden fakultativ pathogenen *E. coli* auch obligat pathogene *E. coli*. Zuletzt rechnet man neben den unten aufgeführten Gruppen auch diffus adhärierende *E. coli* (DAEC), uropathogene *E. coli* (UPEC) und neonatale Meningitis-erregende *E. coli* (NMEC).

4.1. Shiga Toxin produzierende *E. coli* (STEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

Unter STEC werden jene *E. coli*-Stämme zusammengefasst, die Shiga Toxin oder Shiga-ähnliche Toxine produzieren. In diese Gruppe fallen die nachweislich humanpathogenen EHEC, welche ausführlich in Kapitel 5 behandelt werden.

4.2. Enteropathogene *E. coli* (EPEC)

EPEC verursachen insbesondere die Säuglingsenteritis, die unbehandelt zu einer Letalität von 50% führt und daher eine in Entwicklungsländern häufige Ursache hoher Säuglingssterblichkeit darstellt. In Europa und Nordamerika treten EPEC-Infektionen selten auf, meist auf Säuglingsstationen oder Kindertagesstätten. Die Übertragung dieser Pathogene erfolgt in den

meisten Fällen auf dem fäkal-oralen Weg. Die Pathogenese zeichnet sich dadurch aus, dass wenige Stunden nach Infektion eine massive Besiedlung des Dünndarms erfolgt. Die Bakterien lagern sich nach Penetration des Mucus unter Bildung von Mikrokolonien an die Epithelzellen an, wobei der Mikrovillisaum zerstört wird und nachfolgend wässrig-schleimige Durchfälle auftreten. Bekannte Virulenzfaktoren aus EPEC sind auf einer Pathogenitätsinsel LEE (*locus of enterocyte effacement*) sowie extrachromosomal auf einem 60 kDa großen Megaplasmid pEAF (*effacing and attaching factor*) kodiert (Elliott et al. 1998; Baldini und Kaper, 1983). Wegen der starken Homologien zum LEE aus enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) wird an dieser Stelle auf Kapitel 5 verwiesen. Auf pEAF ist ein in EHEC nicht vorfindbares Gencluster aus 14 Genen für den Adhäsionsfaktor der BFP (*bundle-forming pilin*) lokalisiert (Stone et al. 1996). Diese BFP vermitteln möglicherweise eine initiale Bindung der Bakterien an die eukaryontischen Epithelzellen und/oder die Ausprägung von Mikrokolonien durch Quervernetzung der adhärenen Bakterien (Girón et al. 1991). Ein ebenfalls auf dem Megaplasmid kodierter Regulator, Per, induziert *intrans* die Expression mehrerer Virulenzfaktoren des LEE (Kenny et al. 1997a; Gomez Duarte und Kaper, 1995).

4.3. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Wie EPEC kommen auch EIEC-Infektionen vorwiegend in Entwicklungsländern zum Tragen. Die über die fäkal-orale Route oder durch kontaminierte Lebensmittel eingebrachten EIEC rufen ein ruhrähnliches Krankheitsbild hervor, charakterisiert durch die Invasion von Epithelzellen des Kolons, intrazelluläre Vermehrung und Migration bis zur Lamina propria. Klinische Symptome einer EIEC-Infektion sind neben Fieber besonders die blutigen Durchfälle.

4.4. Enterotoxigene *E. coli* (ETEC)

ETEC etablieren die Verursacher der unter dem Begriff "Montezumas Rache" bekannten selbstlimitierenden Reisediarrhoe, die von leichten Durchfällen bis zu Cholera-ähnlichen Symptomen reichen kann. ETEC-Infektionen kommen vorwiegend in warmen Ländern vor und sind aufgrund der hygienischen Verhältnisse in Mittel- und Nordeuropa selten. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral, über verunreinigte Lebensmittel oder Wasser. Die Kolonisation erfolgt im proximalen, normalerweise bakterienfreien Abschnitt des Dünndarms nach Durchdringung des Mucus und Anhaftung an die Epithelzellen mittels Fimbrien, besonders CFA I und CFA II (*colonisation factor antigen*). Im Gegensatz zu EIEC-Stämmen dringen ETEC nicht in die Wirtszellen ein. Die von ETEC produzierten Zellgifte hitzelabiles Toxin (LT) und hitzestabiles Toxin (ST) bewirken über eine Störung des intestinalen Elektrolyt- und Wassertransportes einen schleimigen Durchfall. Das LT ist mit dem Cholera-toxin verwandt und fungiert als Enthemmer der Adenylatcyclase, wodurch es zu einer intrazellulären Anreicherung von cAMP und infolgedessen zur Netto-Sekretion von Wasser, Bicarbonat-, Kalium- und Chloridionen kommt. Das ST aktiviert die Guanylatcyclase, wodurch die intrazelluläre Konzentration von cGMP ansteigt und infolgedessen eine Netto-Sekretion von Ionen und Wasser erfolgt.

4.5. Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)

Die Adhäsion von EAggEC zeichnet sich durch eine geordnete Aneinanderreihung der Bakterien in parallelen Strängen und übereinander aus, was als *stacked brick-like* bezeichnet wird. Durch

EAggEC verursachte Diarrhoe kann länger als 14 Tage anhalten und wurde vor allem für Kinder der Länder Brasilien, Chile, Mexiko und Indien berichtet.

5. Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

Wer mitungewaschenen Händen das Klo verläßt und sein Kind berührt, der handelt fahrlässig.
(Ruder, 1996)

5.1. Definition und Serovare

Der Begriff enterohämorrhagische *E. coli* wurde von Levine et al. (Levine, 1987) geprägt und bezeichnet eine ad dato neue Gruppe pathogener *E. coli*, die das distinkte Krankheitsbild der hämorrhagischen Colitis, eine schwere blutige Durchfallerkrankung, verursachen. EHEC gehören zu den Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (STEC), besitzen also latente Phagen, die ein sehr potentes Zellgift, das Shiga-Toxin (STx), bilden können. EHEC im engeren Sinne umfassen jedoch nach der Definition von Levine (Levine, 1987) nur jene STEC, die die gleichen klinischen, epidemiologischen und pathogenetischen Eigenschaften besitzen wie der "Prototyp" EHEC O157:H7 (s.a. Tarr, 1995). Hierzu gehören neben dem virulentesten Serotyp O157:H7 die O-Gruppen O157:H⁻, O26:H11, O26:H⁻, O103:H2, O111:H2, O111:H⁻, O126:H8, O128:H2 und viele weitere. Involvierte Serotypen in Nordamerika und Europa sind zu schätzungsweise über 60% EHEC O157:H7 (Tarr, 1995). In Südamerika und Ost-Kanada wurden hingegen andere Serotypen wie z.B. O26:H11, O103:H2, O91:H⁻, O145:H⁻, O38:H21, O6:H⁻ und andere verstärkt isoliert (Acheson und Teusch, 1996), in Australien spielt O157 scheinbar kaum eine Rolle, dagegen wurden Infektionen mit O111:H⁻, O6:H31, O98:H⁻ und O48:H21 beschrieben (Acheson und Teusch, 1996). Von den über 200 verschiedenen *E. coli* Serotypen, die STx produzieren, sind nur wenige nachweisbar als humanpathogen eingestuft (Johnson et al. 1996). Der Nachweis der Humanpathogenität erweist sich aufgrund eines mangelnden Systems als schwierig und so erlangten bislang nur solche Stämme die Auszeichnung *humanpathogen*, die sich durch natürliche Infektionen zu erkennen gaben (Tarr, 1995). Prophylaktisch ist jedes STx produzierende Bakterium als potentiell humanpathogen einzustufen, auch wenn die Bildung von STx allein noch nicht für die Ausprägung der Krankheitssymptome ausreicht (Samadpour et al. 1994).

5.2. Durch EHEC verursachte Krankheitsbilder

EHEC verursachen in erster Linie Darmerkrankungen, deren Verlauf von mildem Durchfall bis hin zu schwerer hämorrhagischer Colitis (HC) mit lebensbedrohlichen Folgekomplikationen reicht. Bei einer Infektion mit EHEC O157:H7 entwickeln etwa 90% der Fälle HC, nur 10% der Fälle entwickeln eine nicht-blutige Diarrhoe (Tarr, 1995). Ein typisches Krankheitsbild zeichnet sich aus, indem nach 3-9 Tagen der Infektion schmerzhafte und kolikartige Bauchkrämpfe auftreten, begleitet von wässriger Diarrhoe. 1-2 Tage später kann sich das Stadium in frequente, schmerzhafte Entleerungen blutiger Stühle, möglicherweise auch profuse Blutungen verschlechtern. Fieber tritt dabei selten, Erbrechen nur in etwa der Hälfte der Fälle auf. Nach Abklingen der Durchfälle binnen 6-10 Tagen werden jedoch noch bis zu mehreren Wochen lang Erreger ausgeschieden (RKI, 1997).

Besonders Kinder und ältere Menschen sind durch die schwereren Formen einer EHEC-Erkrankung lebensbedrohend gefährdet. Etwa 5-10% der Kinder unter 10 Jahren entwickeln hierbei das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS). EHEC O157 sind weltweit die häufigsten Verursacher des enteropathischen HUS, welches sich durch eine rapide intravasale Hämolyse mit Fragmentierung der Erythrozyten (mikroangiopathische hämolytische Anämie), Thrombozytopenie und Nephropathie mit Hämaturie und Proteinurie auszeichnet. In 50% der HUS-Fälle kommt es zu einem akuten Nierenversagen mit der Notwendigkeit der Dialyse, 10-30% der Fälle enden mit einer terminalen Niereninsuffizienz (Beutin und Niemer, 1995), bis zu 10% der Fälle enden letal (Beutin et al. 1994).

Neben den Durchfallerkrankungen und HUS wurden EHEC auch als Verursacher der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP), bei der symptomatisch neurologische Störungen auftreten, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa (chronische Colitis), nekrotisierende Colitis, Balanitis, Harnwegsinfektionen, Rektumvorfall, Invagination und Appendizitis, toxischer Myokardschaden, Pankreatitis mit nachfolgendem Diabetes mellitus, etc. nachgewiesen (Tarr, 1995; Bockemuehl et al. 1997), wegen der hohen Dunkelziffer von EHEC-Infektionen ein sicherlich erschreckend breites Spektrum EHEC-assoziiierter Krankheiten.

Bei der Behandlung akuter EHEC-Infektionen ist die Vergabe von Antibiotika nicht angezeigt, da hierdurch eine verlängerte Bakterienausscheidung und eine Komplikation des Krankheitsbildes durch die Stimulierung bzw. Freisetzung von STx folgen kann (RKI, 1997). Die Behandlung von HUS, TTP und anderen ausgelösten Erkrankungen hat daher symptomatisch zu erfolgen (RKI, 1997).

5.3. Epidemiologie

EHEC kommen in den meisten Ländern der Erde endemisch vor. Dies liegt hierin begründet, dass das sicherlich größte Erreger-Reservoir in Rindern und anderen landwirtschaftlich genutzten Wiederkäuern wie z.B. Schafe und Ziegen liegt. Somit sind EHEC als zoonotische Krankheitserreger einzustufen, deren Übertragung durch direkten Kontakt zum Tier möglich ist (Renwick et al. 1994; Gallien et al. 1997). EHEC der Serogruppe O157 kommen in etwa 1-2% der untersuchten Kotproben von gesunden Rindern vor, während hingegen andere STEC mit bis zu 80% Häufigkeit vertreten sind (Beutin et al. 1993). Bei Untersuchungen an gesunden Berliner Nutztierbeständen konnten STEC aus dem Kot von 21,1% der Rinder, 56,1% der Ziegen und 66,6% der Schafe isoliert werden (Beutin et al. 1993). Es ist aber auch eine Vielzahl anderer natürlicher Wirte und Vektoren nachgewiesen worden, so u.a. Schweine, Hunde, Katzen, Vögel und der Mensch, so dass das Übertragungspotential breit gefächert ist. Eine Studie belegte die Möglichkeit der Verbreitung durch Küken, indem diese zu Dauerausscheidern wurden und sukzessive die von ihnen im Erwachsenenstadium gelegten Eier auf der Oberfläche EHEC aufwiesen (Schoeni und Doyle, 1994). Gerade auch im humanitären Bereich ist der Schmierinfektion angesichts der langen Ausscheidungsphase nach Rekonvaleszenz eine hohe Bedeutung beizumessen (Karmali, 1989; Griffin und Tauxe, 1991). Seltener, jedoch erwähnenswert, wurde von Wasser als Infektionsquelle berichtet, sowohl in Trinkwasser (Swerdlow et al. 1992), als auch in einem Badensee (Keene et al. 1994). Es existieren Berichte über viele weitere Infektionsquellen, wie z.B. Lamm, Schwein, Geflügel oder Meeresfrüchte (Samadpour et al. 1994). Am häufigsten jedoch wurden Rindfleisch, Kuhmilch und andere

Rinderprodukte als Quellender EHEC-Kontamination beschrieben. Tatsächlich ist EHEC als der Erreger der "Hamburger disease" in die Geschichte eingegangen, als 1992 über 500 Kunden einer *Fast Food* Kette in mehreren über die USA verteilten Städten nach Verzehr von kontaminierten Hamburgern erkrankten (MMWR, 1993). In dem bislang größten nachgewiesenen Ausbruch wurden 1996 in Japan 9578 meist Schulkinder durch den Verzehr von Rettichsprossen infiziert, 11 Infizierte starben (WHO, 1996C).

EHEC sind somit in die Klasse der Lebensmittelerreger einzuordnen, und ihre Fähigkeit, großflächige Ausbrüche zu verursachen verdanken sie nicht zuletzt ihrer extrem geringen Infektionsdosis von 10-100 CFU, was im Bereich der Infektionsdosis von *Shigella* liegt. Im Vergleich hierzu werden für eine Infektion mit *Salmonella* etwa 100.000 CFU benötigt. Die Kombination von sehr geringer Infektionsdosis, Widerstandsfähigkeit gegen niedrige pH-Werte, Kälte und Austrocknung und Überlebensdauer in reinem Wasser sowie die Produktion von STx verleiht EHEC ein sehr hohes Gefährdungspotential, was in den letzten Jahren zunehmend auch in das Bewußtsein der Lebensmittelindustrie gerückt ist (Power et al. 1998; Grifetal. 1998; Delazarietal. 1998; Cassinetal. 1998). Auch für den Laboralltag ist das Risiko einer EHEC-Infektion nach mehreren Laborinfekten, wovon sich bei einer Infektion HUS entwickelte (Rao et al. 1996; Kniehl, 1997), neu eingeschätzt worden, so dass diese Pathogene von der Risikogruppe 2 in die Risikogruppe 3 * eingeordnet wurde (Schubert, 1997).

Das tatsächliche Ausmaß von EHEC-Infektionen ist wegen der anzunehmenden Dunkelziffer, bedingt durch unzureichende diagnostische Handhabe sowie fehlende Erfassung milder Infektionsverläufe, nicht genau quantifizierbar (Tarr, 1995). Allerdings scheint es länder- und ortsspezifische Unterschiede zu geben. So infizieren sich in Schottland jährlich über 9/100.000 Einwohner, in Italien dagegen unter 1/100.000 und in den USA jährlich mindestens 2-8/100.000 Menschen mit EHEC (Tarr, 1995). Bei Stuhluntersuchungen in den USA waren EHEC O157 nach Salmonellen und *Campylobacter* die am häufigsten isolierten Krankheitserreger (Tarr, 1995; Griffin und Tauxe, 1991). Für Deutschlands schätzte das Robert Koch Institut (RKI) 1994 die Zahl jährlicher HUS-Fälle auf 400-880 (RKI, 1994). EHEC-Infektionen erreichen damit wegen der Notwendigkeit intensiver Hospitalierungsmaßnahmen und aufwendiger Folgebehandlungen sowie verstärkter Sicherheitsmaßnahmen in der Lebensmittelindustrie ökonomische Ausmaße.

5.4. Immunantwort

Die Immunantwort auf EPEC-Infektionen ist besser untersucht als für EHEC. Es lassen sich jedoch wahrscheinlich Rückschlüsse auf EHEC ziehen, da viele Virulenzfaktoren in Sequenz und Funktion homolog sind. Bei etwa 50% der untersuchten Kinder in Mexiko zeigte sich, dass bereits bei einem Alter unter 1 Jahr ein Titer gegen EPEC vorlag (Neter und Westphal, 1955). Serum und Milch von stillenden Müttern wiesen überdies Antikörper gegen EPEC auf, so dass vermutlich bereits durch das Stillen ein Immunschutz gegen EPEC-Infektionen geboten wird (Cravioto et al. 1988). In Infektionsstudien mit Freiwilligen wurde die Produktion von Antikörpern gegen Intimin (9/9) nachgewiesen (Levine et al. 1985). Für EHEC-Infektionen wurden die Antikörperproduktion gegen serotypisches Lipopolysaccharid und besonders bei HUS-Patienten gegen die sekretierten Esp-Proteine beobachtet (Paton et al. 1998; Jarvis und Kaper, 1996; Grotorex und Thorne, 1994; Chart et al. 1989). Dagegen wiesen lediglich 10% der

gesunden Personen und unter 30% der HUS-Patienten neutralisierende Antikörper gegen STx1 auf und nur wenige gegen STx2 oder STx2c (Karmali und Petric, 1994; Übersicht über STxs. 5.6.3.). Ein Grund hierfür liegt vermutlich in der Interaktion der STx mit menschlichen B-Zellen, woraus eine Verminderung der B-Zellkonzentration erfolgt, insbesondere in den Zentren der B-Zellproduktion (Lingwood, 1994).

5.5. Diagnostik, Kontrolle und Prävention

EHEC O157:H7 fermentiert im Gegensatz zu den meisten *E. coli* nicht Sorbitol und daher wurde als Medium für die Differenzierung von *E. coli*-Stämmen Sorbitol-MacConkey (SMAC)-Agar mit Zusätzen von Cefixim und Tellurit (CT-SMAC) eingesetzt (Wells et al. 1983). Es besteht jedoch ausdrücklich die Gefahr, bei einem solchen Screening Sorbitolfermentation positive EHEC zu übersehen. Serologische Methoden beruhen zunächst auf Agglutinationstests mit Hilfe spezifischer Seren gegen O157. Dieses Vorgehen detektiert zwar die vielleicht gefährlichsten Vertreter von EHEC, übergeht allerdings die Tatsache, dass längst nicht alle EHEC-Infektionen auf diesem Serotyp beruhen (s. 5.1.). Die Methode der immun-magnetischen Separation durch mit Antiserum gegen O157 gekoppelte Beads erwies sich als sehr effektiv im Nachweis sehr gering konzentrierter EHEC im Stuhl, was sicherlich eines der größten Probleme in der Diagnostik darstellt. Aber wie beim Agglutinationstest besteht auch hier die Gefahr der Serospezifität. Dagegen stellt der direkte Nachweis von *stx* (s. 5.6.3.) oder anderen spezifischen Virulenzgenen durch PCR-Techniken eine sehr sensitive Methode dar, die fähig sein sollte, die gesamte Population von EHEC nachzuweisen (Weaver und Rowe, 1997; Gilgen et al. 1998; Bastian et al. 1998). Hier besteht wiederum der Nachteil, dass der Großteil der Routinelabors für derartige Verfahren nicht ausgerüstet ist.

Weitere Nachweismethoden sind Kulturdiagnostik mit Enterohämolysin-Agar, wodurch ca. 90% der EHEC-Stämme erfasst werden können, chromogene Agar (z.B. RainbowTM Agar), der direkte Nachweis von STx im Stuhl durch einen Verotoxizitätstest oder indirekt durch ELISA (VT-EIA) (Tarr, 1995). Keine der genannten Methoden für die Routine ist als alleinige Screeningmethode geeignet, da in keinem Falle die gesamte EHEC-Population nachweisbar ist. Erst die Kombination ausgewählter Methoden kann alle Lücken des Screenings schließen. Immerhin ist es möglich, mittels verschiedener auch in der Routine einsetzbarer Verfahren den für Nordamerika und Europa epidemiologisch bedeutendsten Serotyp O157 sicher zu detektieren.

Die Infektionsdosis für eine EHEC-Infektion ist ebenso niedrig wie für *Shigellae* (Keene et al. 1994; DuPont et al. 1989). Deswegen sind EHEC-Patienten als hochkontagiös einzustufen und vom öffentlichen Kontakt fernzuhalten (Tarr, 1995). Der Erregernachweis durch Routinelabors fällt nach Rekonvaleszenz in vielen Fällen negativ aus, obgleich die Ausscheidungsdauer mitunter mehrere Wochen andauert, so dass ein alleiniger negativer Erregernachweis nicht genügend Aussagekraft für Entwarnung bietet (Tarr, 1995). Andererseits kann der Infizierte beim Auftreten von HUS und/oder TTP bereits die Bakterien geklärt haben, so dass in solchen Fällen als letzte Aufklärungsmöglichkeit über die Infektionserreger die serologische Untersuchung auf Antikörper durch ELISA oder Immunoblot bleibt (RKI, 1997). Obgleich die durch EHEC hervorgerufene Durchfallerkrankung nach §§ 3-5 des Bundes-Seuchengesetzes unter "Enteritis infectiosa, übrige Formen" einer Meldepflicht unterliegt, ist die epidemiologische Erfassung der EHEC-Infektionen in Deutschland noch nicht gegeben (RKI,

1997), wodurch die Möglichkeit einer massiven Unterschätzung der Infektionszahlen gegeben ist (Tarr, 1995).

Die Prävention von EHEC-Infektionen kann in vielen Fällen individuell und einfach durch die Einhaltung der durch die WHO (www.who.ch) aufgestellten "10 goldenen Regeln" durchgeführt werden. Darin wird der umsichtige und verantwortungsbewusste Umgang mit Lebensmitteln unter Bewahrung simpler Hygienemaßnahmen propagiert. Dennoch sind mehrere Labors darum bemüht, geeignete Impfstoffkandidaten gegen STEC zu konstruieren. Eine bereits fortgeschrittene Studie verzeichnete erste Erfolge. Darin produzierten 87 vakzinierte Kandidaten einen genügenden Titer gegen das verwendete LPS, der in einem *in vitro* Zellversuch die Virulenz von EHEC O157 inhibierte (Konadu et al. 1998). Als Phase 2-Stufe ist der Versuch an Kindern geplant (Konadu et al. 1998). Dieser potentielle Impfstoff allerdings ignoriert die Situation, dass andere Serotypen ebenfalls klinische Symptome auslösen können und dass sogar in vielen Ländern der Serotyp O157 nicht die Hauptrolle in der Epidemiologie von EHEC spielt (Tarr, 1995; Konadu et al. 1998).

5.6. Eigenschaften von EHEC

Die Kolonisierung des menschlichen Dickdarms durch EHEC erfolgt morphologisch vergleichbar zur Besiedlung des Dünndarms durch EPEC (s. 5.6.1.). Die minimale Infektionsdosis von EHEC hierfür liegt unter 100 Bakterien und ist somit so niedrig wie bei *Shigella*. Begründet wird die hohe Infektiosität vornehmlich mit zwei Eigenschaften von EHEC: i) die Säuretoleranz (s. 5.6.2.) und ii) die Bildung hochpotenter Cytotoxine (s. 5.6.3.). Aber auch plasmidkodierte Virulenzfaktoren (s. 5.6.5.) und mit EPEC homologe Faktoren einer Pathogenitätsinsel (s. 5.6.6.) tragen entscheidend zur Pathogenität von EHEC bei.

5.6.1. Morphologie des *attaching and effacing*

EHEC penetriert vergleichbar mit EPEC den Mucus und haftet sich unter Bildung von Mikrokolonien fest an die eukaryontischen Epithelzellen an. Dabei wird der Mikrovillisaum zerstört und es treten nachfolgend wäßrig-schleimige Durchfälle auf. Umfassend werden die Zerstörung der Mikrovilli, enge Anhaftung der Bakterien an die Epithelzellen und Reorganisation des Cytoskelets als *attaching and effacing lesion* (A/E) bezeichnet. Die feste Anhaftung der Bakterien wird histopathologisch durch das Auftreten von *pedestals* oder *pedestal-like cups* untermalt (Hall und Reynolds, 1985), die sich in einem Abstand von weniger als 10 nm entlang der anliegenden Oberfläche der Bakterien ausbreiten. Die *pedestals* bestehen u. a. aus einem dichtgepackten mikrofilamentösen Netz mit akkumuliertem F-Aktin, α -Aktinin (Finlay et al. 1992), phosphorylierter Myosin-Leichtkette (Manjarrez Hernandez et al. 1992) sowie Talin und Ezrin (Finlay et al. 1992), die die Aktinfilamente verknüpfen (Reese et al. 1990; Burridge et al. 1990). Die bei Infektionen mit EPEC und manchen EHEC-Stämmen auftretende Tyrosin-Phosphorylierung des durch die Bakterien selbst translokierten Rezeptors (Kenny et al. 1997b) - sichtbar unterhalb adhärenter Bakterien bei entsprechenden immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen - ist entbehrlich, wie durch die Infektion mit EHEC EDL933 oder durch die Inhibition von Tyrosin Kinasen während *in vitro* Infektionen mit EPEC (Rabinowitz et al. 1996) deutlich wird. Es wird dagegen diskutiert, ob die Phosphorylierung zu einer Steigerung der Adhäsivität führt. Die nach einer Adhäsion von EPEC

und EHEC an die Wirtszellen beobachtete Signaltransduktion, die sich nach Aktivierung der Phospholipase C- γ 1 in dem Anstieg von Inositol-1,4,5-triphosphat und intrazellulärem Ca²⁺ widerspiegelt (Foubister et al. 1994; Baldwin et al. 1991), dient möglicherweise der beobachteten Reorganisation des Cytoskelets und der Ausbildung der *pedestals*, unterliegt aber z.Z. ebenfalls der Diskussion eines Sekundäreffekts der Infektion (Ismail et al. 1995; Bain et al. 1998).

5.6.2. Säurepersistenz von EHEC

EHEC sind in der Lage, saure pH-Werte, die denen des Magens ähneln, zu überstehen. So wurde nachgewiesen, dass viele EHEC-Stämme nach 2h Inkubation in Luria Bertani-Medium, pH 2,5 eine Überlebensrate >10% aufwiesen (Waterman und Small, 1996). Somit ist dieser Erreger derart beschaffen, dass er den verdauungsaktiven Magen (pH < 3.0; Gordon und Small, 1993) ohne Schaden passieren kann und dementsprechend kann das Inokulum einer Infektion relativ niedrig sein. Die Anpassungsfähigkeit von EHEC an saure Bereiche betrifft aber auch Lebensmittel, die durch Ansäuerung haltbar gemacht werden sollen. So wurde nachgewiesen, dass sich EHEC in Apfelsaft (pH 3,4) oder in Mayonnaise (pH 3.6-3.9) sowie während einer Wurstfermentation auch bei einer Temperatur von 5°C zwar nicht vermehren, jedoch gut überleben können (Zhaou und Doyle, 1994; Weagant et al. 1994; Leyer et al. 1995). Derartig mit EHEC kontaminierte Lebensmittel sind häufig Quellen neuer Infektionen.

In EHEC gibt es mindestens zwei Systeme, um niedrige pH-Werte zu überleben: (i) Säure-Toleranz und (ii) Säure-Resistenz. (i) Ein gemäßigt saures Milieu (pH 5.9, z.B. angesäuerte Lebensmittel) führt zur Säure-Toleranz, bei der die Bakterien selbst bei pH 3.3 überlebensfähig bleiben (Goodson und Rowbury, 1989). (ii) Das System der Säure-Resistenz involviert den alternativen Sigmafaktor RpoS, wodurch die Bakterien in der stationären Phase verharrend eine 10^3 - 10^4 fach erhöhte Resistenz gegenüber niedrigen pH-Werten erhalten (Gordon und Small, 1993). Diese Bakterien benötigen auch keine vorherige Exposition in saurem oder angesäuertem Medium und überleben 2h bei pH 2.5. Spezifische RpoS-regulierte Säureresistenzgene wurden bislang nicht gefunden, aber *Shigellae* und *E. coli* besitzen möglicherweise ein solches/solche Gen(e), da *Salmonella* trotz ihres *rpoS*-Allels pH-Werte unter pH 3.0 nicht überleben (Small et al. 1994; Fan et al. 1992).

5.6.3. Bildung von Shiga-Toxinen

Bei infizierten Personen fiel mit herkömmlichen Methoden auf verschiedenem Indikator agar oft trotz schwerer Symptome der direkte Erregernachweis negativ aus. Die Anzahl an lebenden EHEC im Intestinaltrakt ist demnach bei Erreichen des Klimax klinischer Symptome so niedrig, dass mit Hilfe einfacher Agarnährböden keine EHEC aus dem Stuhl kultivierbar sind. Die Symptome wie HUS oder TTP sind auf lysogene Bakteriophagen zurückzuführen, die STx exprimieren (Strockbine et al. 1986). In Kaninchen-Darmschlingen führt die Vergabe von STx zu einer Netto-Sekretion von Flüssigkeit, STx ist letal für kultivierte Dickdarmzellen, wobei *in vivo* durch die Bindung an das kapillare Endothel pathophysiologisch die Primärwirkung von STx in der kapillaren Endothelschädigung liegt, STx fungiert als Neurotoxin und ist toxisch für kultivierte menschliche Venenepithelzellen des Nabels und Endothelialzellen der Niere. Die

zuletzt genannten Wirkungseigenschaften erklären die systemische Mikroangiopathie nach HUS (Obrig et al. 1993; O'Brien et al. 1992).

Die Nomenklatur dieser hochpotenten Zellgifte hat sich mehrfach geändert: Verotoxine, Shiga-ähnliche Toxine oder STx sind synonym verwendbar, wobei STx die aktuelle Bezeichnung darstellt. In *E. coli* kommen mehrere STx vor (STx1, STx2, STx2c, STx2v, STx2e, etc.). STx1 ist in seiner enzymatischen A-Untereinheit (32.200 Da) bis auf eine Aminosäure, in der B-Untereinheit (7.700 Da) abgesehen vom Signalpeptidbereich 100% identisch zum Shiga-Toxin aus *Shigella*. STx2 lässt sich im Gegensatz zu STx1 nicht durch Antiserum gegen das Shiga-Toxin aus *Shigella* neutralisieren und weist nur 56% Similarität zu STx1 auf Basis der Aminosäuresequenzen auf (Jackson et al., 1987). Hingegen scheint die Cytotoxizität von STx2 höher zu sein als von STx1 (Louise und Obrig, 1995).

Das Holo-Protein der STx ist in dem Verhältnis von einer A-Untereinheit zu fünf B-Untereinheiten aufgebaut (O'Brien et al. 1992). Nach proteolytischer Prozessierung mit Hilfe einer bakteriellen Protease bleibt das enzymatisch aktive A1-Fragment (~27 kDa) nun noch durch eine Disulfidbrücke mit dem A2-Fragment (~4 kDa) verbunden. Das umgebende B-Untereinheiten-Pentamer vermittelt den Kontakt zur eukaryontischen Zelle, indem eine spezifische Bindung an einen Glycolipidrezeptor der Zelloberfläche, Globotriasylceramid (Gb₃) oder im Falle von STx2e an Gb₄ ausgebildet wird (Lingwood, 1996). Die Aufnahme in die Zelle erfolgt über Clathrin-coated pits, gefolgt vom Transport mittels des trans-Golgi Netzwerkes zum endoplasmatischen Retikulum, wo das A1-Fragment als spezifische N-Glycosidase einen Adeninrest von der 28S-rRNA abspaltet. Infolgedessen ist die Elongationsreaktion inhibiert (Reisbig et al. 1981). Es werden z.Z. der Transport von STx zum Ort der bedeutendsten Schädigung für den Wirt, nämlich zur Niere, sowie die Beteiligung von Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-6 am Krankheitsprozess des HUS diskutiert (Tesh et al. 1994). Die Expression der STx wird, abgesehen von STx2c und STx2e, durch hohe Eisenkonzentration oder niedrige Temperaturen reprimiert.

5.6.4. Bildung anderer Toxine

CLDT (*cytolethal distending toxin*) wird von einigen STEC-Stämmen produziert und bewirkt eine progressive Ausdehnung der betroffenen eukaryontischen Zellen.

CNF (*cytotoxic necrotising factor*) bewirkt die Bildung großer polynuklearer Eukaryontenzellen. Man unterscheidet CNF1 (115 kDa) und CNF2 (110 kDa). CNF2 verursacht bei Injektion in Schafeneurologische Schäden und mucoide Diarrhoe.

Savarino et al. stellten 1996 eine Untersuchung vor, in der gezeigt wurde, dass 75 von 75 klinischen EHEC O157:H7-Isolaten mit einer EAST1-DNA-Sonde hybridisierten (Savarino et al. 1996). EAST1 (*EAggEC heat-stable enterotoxin 1*) ist ein Toxin mit einem geringen Molekulargewicht, das ursprünglich EAggEC zugeschrieben wurde, aber in dieser Analyse wurde das Gen auch in EHEC-, EPEC- und ETEC-Stämmen gefunden. Im Gegensatz dazu waren keine der getesteten EIEC-, *Vibrio*- oder *Yersinia*-Stämme positiv für EAST1.

Das Enterohämolysin kommt bei etwa 90% der EHEC vor, ist Megaplasma kodiert und trägt zur Virulenzsteigerung bei (Schmidt et al. 1995; Beutin et al. 1989). Der lytische Effekt als porenbildendes Cytolysin kann durch die Bildung von Lysehöfen bei Wachstum von EHEC auf gewaschenen, nicht jedoch auf ungewaschenen Schafsblut-Agarplattensichtbar gemacht werden.

Enterohämolysin wird in der späten logarithmischen Phase exprimiert und ist ein 60 kDa großes Protein der äußeren Membran.

5.6.5. Plasmidkodierte Faktoren

Das in EHEC EDL933 und den meisten anderen EHEC-Stämmen enthaltene Megaplasmid pO157 mit einer Größe von etwa 60 kDa (~93 kb) enthält zusätzliche Virulenzfaktoren, die - Tierversuchen zufolge - zur Ausprägung typischer Krankheitssymptome offensichtlich nicht notwendig sind (Kaper, 1998). Andererseits deutet die zugewiesene Funktion darauf hin, dass die plasmidkodierten Faktoren die Infektion durch EHEC fördern. PssA/EspP ist eine Serin-Protease, die den humanen Koagulationsfaktor V spaltet (Djafari et al. 1997; Brunder et al. 1997) und sich möglicherweise für die auftretenden intestinalen Blutungen mit verantwortlich zeichnet (Brunder et al. 1997). Ein plasmidkodiertes 69 kDa großes Hämolysin der RTX-Familie (Schmidt et al. 1995; Bauer und Welch, 1996) trat in einer Studie in 88% der Fälle mit HUS, jedoch nur in 22% der Fälle mit Diarrhoe aber ohne HUS auf (Schmidt und Karch, 1996). Eine Funktion dieses Hämolysins könnte in der Freisetzung von Eisen aus Erythrocyten liegen, das dann über ein chromosomal kodiertes Eisentransportsystem in die Bakterien aufgenommen wird. Das chromosomal kodierte ChuA dient hierfür als Eisen reguliertes Häm-Transport-Protein (Torres und Payne, 1997). Die Rolle eines auf pO157 kodierten Typ II-Sekretionssystems respektive der hierdurch sekretierten Faktoren wurden bislang noch nicht aufgeklärt (Schmidt et al. 1997; s. 5.6.6.).

5.6.6. Sekretionsmechanismen und Effektorproteine

Die Pathogenität von Bakterien ist entscheidend geprägt durch die Interaktion zwischen Bakterium und Wirtszelle. Als kritische Faktoren dienen im besonderen Proteine auf der bakteriellen Oberfläche sowie sekretierte Proteine (Hueck, 1998). Als 'Sekretion' wird hier der aktive Transport der Proteine durch die bakterielle innere und äußere Membran verstanden und setzt sich vom Begriff 'Export' ab, welcher den Transport von Proteinen durch die innere Membran in das Periplasma beschreibt (Salmond und Reeves, 1993; Pugsley, 1993a). In Abb. 3 werden schematisch die Sekretionssysteme Typ I, II und III vorgestellt (nach Hueck, 1998), die Typ IV und Typ V Sekretionssysteme sind nicht dargestellt.

Die Typ II und Typ IV Sekretionsmechanismen beinhalten einen 2-stufigen Transport, zunächst in das Periplasma, gefolgt vom Transport durch die äußere Membran, und zeichnen sich durch ihre Abhängigkeit vom *sec*-System aus (Hueck, 1998). SecD, SecE, SecF und SecY sind Proteine der inneren Membran, SecA ist eine mit der inneren Membran assoziierte ATPase, SecB fungiert als Chaperon für die sekretierten Proteine und darüberhinaus existieren weitere Komponenten des *sec*-Systems (Pugsley, 1993a; Murphy und Beckwith, 1996). Für die Sekretion benötigt das Zielprotein eine etwa 30 Aminosäuren lange Signalsequenz am N-Terminus, die beim Export durch eine periplasmatische Signalpeptidase abgespalten wird (Hueck, 1998). Für das Typ IV Sekretionssystem sind Komponenten in der äußeren Membran entbehrlich, da die durch diesen Mechanismus sekretierten Proteine die Klasse der Autotransporter darstellt, also selbst die vollständige Information für ihren Transport durch die äußere Membran enthalten. Wahrscheinlich bilden sie eine Pore in der äußeren Membran, und ein Teil des Proteins wird durch autoproteolytische Spaltung in die Umgebung freigesetzt. Zu

diesen Autotransportern gehört die Serin-Protease PssA/EspP aus EHEC (Djafari et al. 1997; Brunder et al. 1997).

Das Typ II Sekretionssystem benötigt für den Transport durch die äußere Membran weitere Proteine. Das Pullulanase-Sekretionssystem aus *Klebsiella oxytoca* dient wegen der fortgeschrittenen Studien als Modellsystem. Ein homologes, ebenfalls 14 Gene enthaltendes Gencluster ist auf O157 in EHEC kodiert (Schmidt et al. 1997) und somit liegt die Vermutung nahe, dass einige Virulenzfaktoren aus EHEC über ein Typ II Sekretionssystem ausgeschleust werden.

Das Typ I Sekretionssystem erweist sich im Gegensatz zu den o.g. Sekretionssystemen als *sec*-unabhängig. Zwar existiert eine Signalsequenz innerhalb der letzten 60 Aminosäuren des C-Terminus, die für verschiedene Subfamilien spezifisch ist - z.B. wird α -Hämolyisin aus *E. coli* nicht durch das Typ I Sekretionssystem für Proteasen sekretiert, und umgekehrt (Hueck, 1998) -, aber es erfolgt keine proteolytische Abspaltung eines Signalpeptids, und das sekretierte Protein erfährt keinen Export in das Periplasma, sondern wird direkt sekretiert (Wandersman, 1996; Fath und Kolter, 1993).

Das Typ III Sekretionssystem etabliert das zweite *sec*-unabhängige System zum Transport von Proteinen, in dem die Zielproteine ohne Zwischenstop im Periplasma und ohne Prozessierung direkt sekretiert werden. Das Signal für die Sekretion scheint innerhalb der ersten 15-20 Aminosäuren zu liegen, da Reporterproteine mit diesem Abschnitt über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleust wurden (Sory et al. 1995; Schesser et al. 1996). Dagegen konnte die Form der Kodierung bislang nicht entschlüsselt werden, da eine große Toleranz in der Änderung der Aminosäuresequenz gegeben ist (Sory et al. 1995; Michiels und Cornelis, 1991; Hueck, 1998). Anderson und Schneewind fanden heraus, dass selbst Mutationen, die einen Frameshift dieser N-terminalen Signalsequenz bewirkten, die Sekretion der (nach der Signalsequenz *in frame* korrigierten) Reporterfusionen nicht verhinderte (Anderson und Schneewind, 1997). Daher wird auch eine Beteiligung des 5'-Bereiches der mRNA an der Sekretion diskutiert (Anderson und Schneewind, 1999).

Wenn gleich die Zielproteine des Typ III Sekretionssystems wie beim Typ I Sekretionssystem *sec*-unabhängig ausgeschleust werden, so scheint der Aufbau des Systems *per se* vom *sec*-System abhängig zu sein, da Komponenten des Typ III Sekretionssystems typische aminoterminalen Signalsequenzen enthalten (Hueck, 1998). Das Typ III Sekretionssystem beinhaltet mindestens 20 Proteine, die zu einem Großteil Komponenten der inneren Membran darstellen, aber auch beispielsweise ein putativ porenbildendes Protein der äußeren Membran (EscC in EHEC) oder eine cytoplasmatische, möglicherweise membranassoziierte ATPase (EscN in EHEC) (Hueck, 1998). Die Komponenten für den Transport durch die innere Membran sind genetisch trennbar von den Transportkomponenten der äußeren Membran (Charkowski et al. 1997), so dass hier die Kopplung zweier Transportkanäle vorliegt.

Interessanterweise beinhaltet das Typ III Sekretionssystem Homologien zum Biosyntheseapparat für Flagellen aus Gram-negativen und Gram-positiven Organismen auf, in der Komponente des P- und L-Rings eine N-terminale Signalsequenz enthalten und über das *sec*-System in das Periplasma exportiert werden (Jones et al. 1989). Es finden sich Proteine im übrigen Flagellensystem, die zu den über das Typ III Sekretionssystem sekretierten Proteinen homolog sind und

ohne aminoterminalen Signalsequenz über ein Flagellum spezifisches Transportsystem ausgeschleust werden (Macnab, 1992; Kuwajima et al. 1989). Auch andere nicht sekretierte Komponenten des Typ III Sekretionssystems weisen signifikante Homologien zur flagellaren Biosynthese auf, so z.B. EscC aus EHEC/EPEC, ein Protein der äußeren Membran, das zur GspD-Familie von Bakterien- und Phagen-Proteinen gehört und homolog zu YscC, dem Kanal bildenden Protein der äußeren Membran in *Yersinia* spp., und PulD, dem Sekretin des Typ II Sekretionssystems in *Pseudomonas aeruginosa*, ist (Hueck, 1998).

Infolge der Aktivierbarkeit des Typ III Sekretionssystems durch den Kontakt der Bakterien mit eukaryontischen Zellen wird der Mechanismus auch als *contact dependent system* bezeichnet (Lee, 1997). EPEC und EHEC sekretieren zwischen 5 (Kenny und Finlay, 1995; Ebel et al. 1996) und 11 (Jarvis et al. 1995) Proteine über den Typ III Sekretionsmechanismus. Die sekretierten Proteine werden in der Nomenklatur als Esp (*E. coli* sekreted protein) geführt. Dazu Beginn der vorliegenden Arbeit lediglich EspB aus EPEC E2348/69 bekannt war und Teile dieser Arbeit der Identifikation und Charakterisierung neuer Virulenzfaktoren aus EHEC (u.a. EspA und EspD) dienten, wird in der Diskussion näher auf die einzelnen Esp Proteine und deren Funktionen eingegangen.

Die Sekretion durch EHEC/EPEC wird zusätzlich in Zellkulturmedium, millimolaren Konzentrationen von $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ und durch NH_4^+ angeregt und benötigt $\text{Na}_2(\text{CO}_3)_2$ und Ca^{2+} . Die Funktion des Typ III Sekretionssystems liegt über der Sekretion von Virulenzfaktoren hinaus in der gerichteten (polarisierten) Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle. Tatsächlich dürften die gefundenen Bedingungen zur Sekretion von Proteinen in das Medium als experimentelle Artefakte gewertet werden, die lediglich regulatorische Konditionen widerspiegeln, wie sie möglicherweise bei Kontakt der Bakterien mit den eukaryontischen Wirtszellen vorliegen (Hueck, 1998). Stattdessen steht die gezielte Inokulation bakterieller Effektoren im Vordergrund pathologischer Prozesse *in vivo*. Für EPEC konnte gezeigt werden, dass bereits 5-10 min nach Kontakt der Bakterien mit den eukaryontischen Zellen - zu diesem Zeitpunkt wurden die Bakterien mittels Gentamicin abgetötet - genügend Effektorproteine translokiert waren, um den histopathologischen Prozess des *attaching and effacing* vollständig durchzuführen (Rosenshine et al. 1996a). Demnach erfolgt die Translokation sehr schnell und gezielt, und es dürfte ein spezifischer Translokationsapparat für eine derartige Inokulation von Nöten sein, nicht etwa nur eine einfache Sekretion. Für *Salmonella* und *Pseudomonas* wurden supramolekulare Strukturen auf der Oberfläche der Bakterien nachgewiesen, die eine Rolle in der Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszellen spielen (Roine et al. 1997b; Ginocchio et al. 1994) und die aus Proteinen zusammengesetzt sind, die über das Typ III Sekretionssystem sekretiert werden. Bei *Salmonella* ermöglichen die *Invasomen* genannten Oberflächenstrukturen durch Manipulation der eukaryontischen Wirtszelle die Vorbereitung zur Invasion (Ginocchio et al. 1994).

Für die Zielproteine des Typ III Sekretionssystems werden des Weiteren spezifische Chaperone benötigt, die eine vorzeitige Interaktion der Zielproteine untereinander oder mit Komponenten des Typ III Sekretionssystems im Cytoplasma verhindern (Hueck, 1998). Diese Chaperone oder *bodyguards* (Woestyn et al. 1996) besitzen meistens charakteristische strukturelle und physiochemische Eigenschaften: relativ kurze Aminosäuresequenzen (unter 20 kDa), einen sauren isoelektrischen Punkt (pI), eine α -Helix im C-Terminus, und sie sind im Cytoplasma

lokalisiert (Wattiau et al. 1996; Hueck, 1998). In der Regel sind die Chaperone des Typ III Sekretionssystems spezifisch für individuelle sekretierte Proteine, aber sie zeigen keine ATP hydrolysierende Aktivität (Wattiau et al. 1996). Für EHEC/EPEC lautet (i.d.R.) die Nomenklatur der Chaperone Ces (*chaperone for E. coli secreted protein*) und es konnten spezifische Chaperone für diese sekretierten Proteine EspB (CesD), EspD (CesD) sowie für den translokierten Intimin-Rezeptor EspE/Tir (OrfU) identifiziert werden (Wainwright und Kaper, 1998; Elliott et al. 1998).

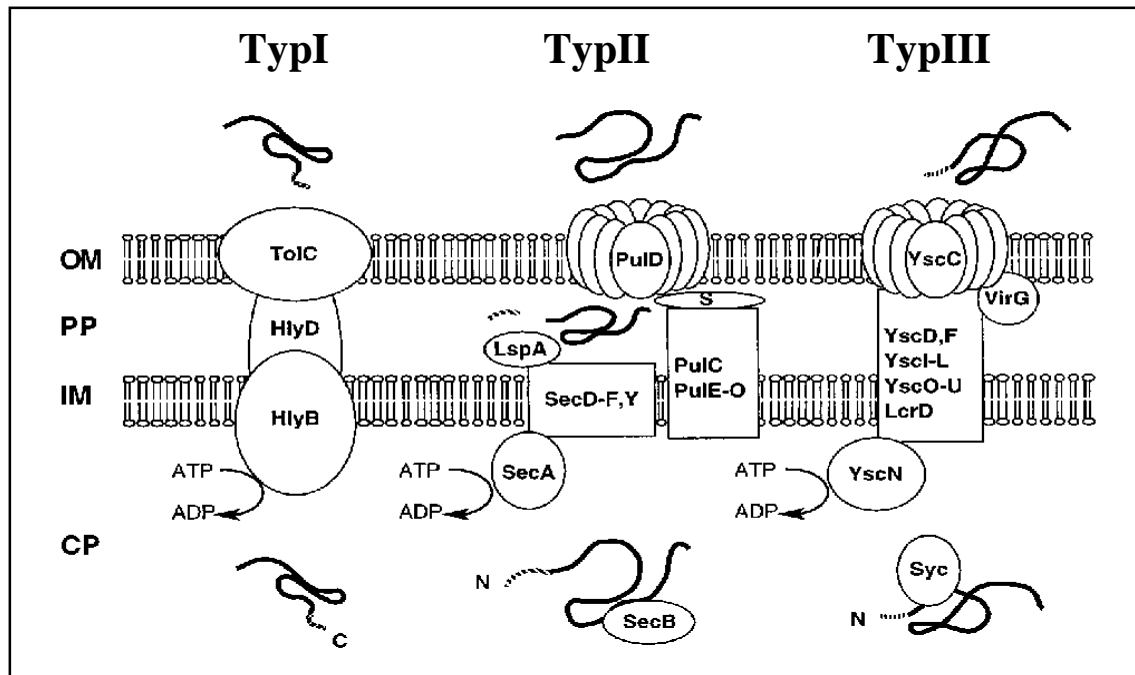


Abb. 3: Schematischer Überblick der Sekretionssysteme I, II und III (modifiziert nach Hueck, 1998). Typ I, α -Hämolysin-Sekretionssystem aus *E. coli*; Typ II, Pullulanase-Sekretionssystem aus *Klebsiella oxytoca*; Typ III, Yop-Sekretionssystem aus *Yersinia*. OM, äußere Membran; PP, Periplasma; IM, innere Membran; CP, Cytoplasma. Die ATP-Hydrolyse durch HlyB, SecA oder YscN ist angegeben. Die Lokalisation der Sekretionssignale innerhalb der sekretierten Proteine wird durch Schattierung angezeigt. N, N-Terminus; C, C-Terminus. Für den Typ III Sekretionsmechanismus könnte das Sekretionssignal im 5'-Bereich der mRNA für das sekretierte Protein kodiert vorliegen. Die Typ II und Typ III Sekretionssysteme enthalten Chaperone (SecB bzw. Syc). Im Typ II Sekretionssystem wird das N-terminale Sekretionssignal durch eine periplasmatische Peptidase (LspA) nach Export durch das *sec*-System abgespalten. Die Typ II und Typ III Sekretionssysteme enthalten homologe multimeren Komponenten der äußeren Membran (PulD, YscC), während sich die Hilfsproteine PulS bzw. VirG, die die Insertion von PulD bzw. YscC in die äußere Membran erleichtern, unterscheiden. S. Text für weitere Details.

5.6.7. Adhärenzfaktoren und 4-Stufen-Modell der Infektion eukaryontischer Zellen

Wie EPEC produzieren auch EHEC das 94-97 kDa große Protein der äußeren Membran Intimin. Intimin wird durch *eaeA* kodiert und weist im N-terminalen Bereich starke Homologien (>95% Identität) zwischen den verschiedenen pathogenen *E. coli*-Stämmen sowie *Citrobacter freundii* auf. Die letzten 250 Aminosäuren hingegen beinhalten starke Abweichungen, so dass spekuliert wird, dass dieser Teil des Proteins für die Wirtsspezifität verantwortlich ist, während durch den

N-Terminus des Protein in der äußeren Membran verankert wird (Agin und Wolf, 1997). Die Rezeptoren für Intimin bilden sowohl ein von EHEC/EPEC selbst in die eukaryontische Zellmembran translokierter Rezeptor EspE/Tir (Kenney et al. 1997b; Deibel et al. 1998) als auch möglicherweise α_1 -Integrine (Frankel et al. 1996). Der C-Terminus von Intimin könnte durch das Vorhandensein zweier Domänen durchaus für die Bindung an verschiedene Rezeptoren verantwortlich sein (Frankel et al. 1996), und Sequenzunterschiede im Bindungsbereich könnten ein Grund für die verschiedenen Topologien der intestinalen Kolonisierung von EHEC und EPEC darstellen. So resultierte die *trans*-Komplementation einer *eaeA*-Mutante von EHEC O157:H7 durch *eaeA* aus EPEC in der Kolonisierung der rekombinanten Mutante im für EPEC typisch distalen Dünndarm notobiotischer Ferkel (Tzipori et al. 1995).

Ein bis vor Kurzem gängiges 3-Stufen-Modell zur Adhäsion von EPEC an epitheliale Zellen beinhaltete eine initiale Bindung der Bakterien mittels Typ IV-Pili, den BFP (Rosenshine et al. 1996b; Donnenberg et al. 1992). EHEC besitzen jedoch keine BFP (Gunzburg et al. 1995). Dieser Befund erhebt die Frage, welche Faktoren aus EHEC die initiale Bindung der Bakterien an die Wirtszellen vermitteln. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde von Hicks et al. ein 4-Stufen-Modell für die Infektion von EPEC an Epithelzellen vorgestellt (Hicks et al. 1998), wonach BFP nicht für die initiale Bindung von EPEC an die Wirtszellen, sondern für die interbakterielle Vernetzung zur Ausprägung der typischen dreidimensionalen Mikrokolonien verantwortlich seien. Das vorgestellte 4-Stufen-Modell unterstützt die für EHEC gefundenen Pathogenitätsmechanismen besser als das ursprüngliche Modell, indem eine Initialbindung auch ohne BFP (sondern durch Intimin oder andere noch nicht näher charakterisierte Adhäsine) erfolgen kann und die Ausprägung der Mikrokolonie-Struktur von BFP oder anderen Adhäsinen abhängig ist. Für EHEC wurde von Karch et al. bereits 1987 das Vorliegen Megaplasmid kodierter Fimbrien beschrieben (Karch et al. 1987). Diese Fimbrien wurden in 13/14 EHEC O157:H7-Stämmen aus Patienten mit HC oder HUS beobachtet und korrelierten mit dem Vorliegen von pO157. Eine isolierte Untereinheit der Fimbrien von 16 kDa diente der Herstellung von Antisera, die gegen die meisten EHEC-Stämme, nicht aber gegen EPEC oder ETEC reaktiv waren. Die Transformation eines K12-Stammes mit pO157 führte zur Ausprägung dieser Fimbrien und zur wie im EHEC-Wildtyp-Stamm beobachteten Adhäsion an Henle 407 und nicht an HEp-2-Zellen. Die Charakterisierung der Rolle dieser Fimbrien in der Pathogenität von EHEC, insbesondere in der möglicherweise initialen Bindung an Epithelzellen, wurden nicht fortgeführt.

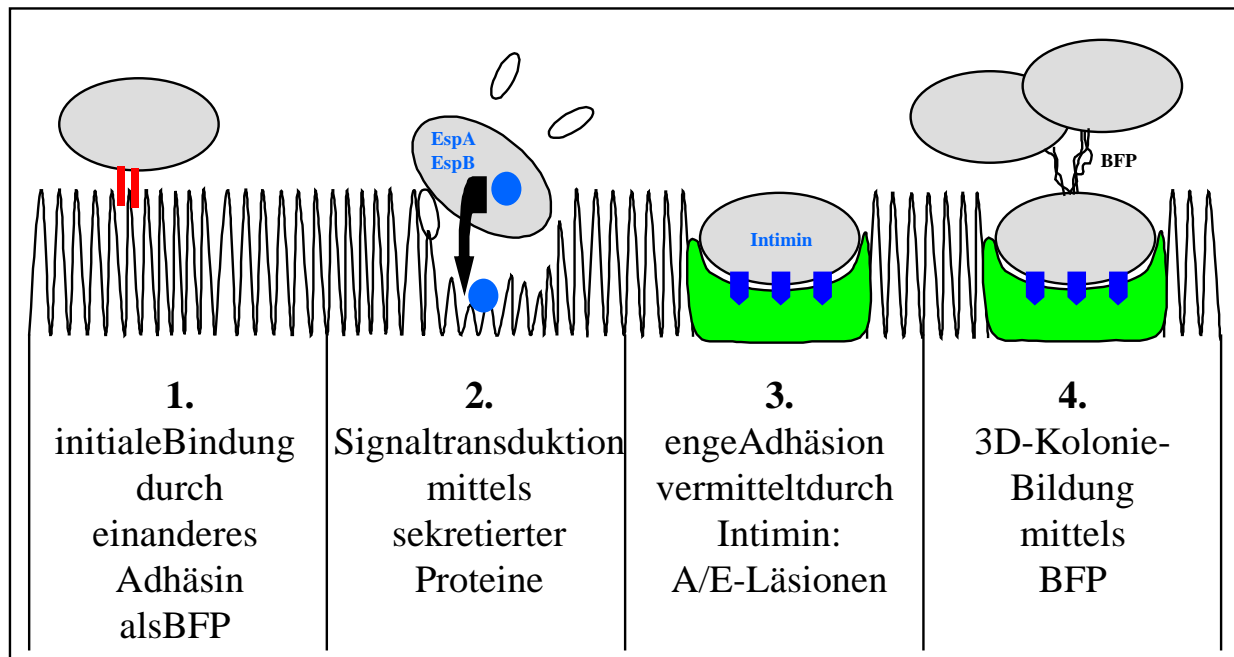


Abb. 4: 4-Stufenmodell der Adhäsion von EPEC an Epithelzellen (modifiziert nach Hicks et al. 1998 und Rosenshine et al. 1996b). (1) Die initiale Bindung von EPEC an eukaryontische Epithelzellen erfolgt mit Hilfe von addat un bekannten Adhäsinen, jedoch nicht durch BFP (*bundle-forming pilus*). Möglicherweise ist auch Intimin bereits in diesem frühen Stadium beteiligt. (2) EPEC sekretiert EspB und andere Proteine, die eine Signaltransduktion initiieren, wodurch unter anderem ein Anstieg von Inositol-Phosphat und intrazellulärem Ca^{2+} erfolgt, gefolgt von einer Reorganisation des Zytoskelets. (3) Die enge Anbindung der Bakterien erfolgt mittels Intimin und es kommt zur phänotypischen Ausprägung des A/E. Während EPEC-Infektionen erfährt der translokierte Intimin-Rezeptor Tir eine Tyrosin-Phosphorylierung und infolgedessen kann eine stabile Intimin-Rezeptor-Bindung erfolgen. Tir dient gleichsam als Nukleator zur Aktinakkumulation, was zur Ausbildung von *pedestals* und seltener zur Invasion der Bakterien führt. (4) Die Expression von BFP resultiert in der Quervernetzung der adhären ten Bakterien unter Bildung dreidimensionaler Mikrokolonien. EPEC-Stämme ohne BFP sind nicht in der Lage, diese Koloniestrukturen aufzubauen und zeigen flache Mikrokolonien.

5.6.8. Genetische Organisation von EHEC EDL933

Im August 1998 veröffentlichten Perna et al. die gesamte 43.359 bp große LEE-Sequenz aus dem EHEC-Stamm EDL933 (Perna et al. 1998; EMBL *acc. no.* AF071034), die wie die LEE-Sequenz aus EPEC E2348/69 und die Pathogenitätsinsel PAI I (*pathogenicity island I*) aus UPEC in dem *hot spot* etablierenden Bereich *selC-yicK* inseriert ist. Der LEE aus EHEC EDL933 (LEE_{EDL933}) ersetzt eine 792 bp lange Sequenz 16 bp downstream von *selC* bis einschließlich eines 5'-Abschnittes von *yicK* (Perna et al. 1998). Den Sequenzvergleichen zufolge unterscheidet sich die Pathogenitätsinsel aus EHEC EDL933 von der 35.624 bp großen LEE-Sequenz aus EPEC E2348/69 (LEE_{EPEC}; Elliott et al. 1998; *acc. no.* AF022236) durch zusätzliche genetische Informationen an den Sequenzenden, nicht aber in der Organisation der durch LEE kodierten Virulenzgene. Vornehmlich ein etwa 7.5 kb großer putativer Prophage am *selC*-Ende des LEE_{EDL933} bestimmt die Divergenz beider Pathogenitätsinseln. Dieser Prophage ist durch repeat eingeraht und weist Homologien zum *E. coli*-Bakteriophagen phi-R73 (Sun et al. 1991) sowie anderen Mitgliedern der CP4-Familie kryptischer Prophagen aus *E. coli* K-12 (Blattner et al. 1997). 13 der in LEE_{EDL933} determinierten ORFs fallen auf ORFs des putativen Prophagen, 41 ORFs hingegen zeigen signifikante Homologien zu den Genen aus LEE_{EPEC} auf,

bis hin zur 100% igen Identität (*escF*, *escS* und *L0052*). Auffällig beim Sequenz-Vergleich der Gene aus beiden LEE ist, dass bis auf eine Ausnahme (*sepZ*, 70,71% Identität) die beschriebenen Komponenten des Typ III Sekretionsapparates stark konserviert sind (95,32 - 100% Identität), während die sekretierten Proteine, insbesondere das Gen für den translokierten Intimin-Rezeptor aus EHEC/EPEC *espE/tir* (66,48% Identität) variieren. Die Divergenz zwischen verschiedenen pathogenen *E. coli* im Locus *eaeA*, dem Gen für Intimin, und die Einteilung von Intimin in mindestens 3 Gruppen wurden bereits früher diskutiert (s. 5.6.7.; Agin und Wolf, 1997; Frankel et al. 1995; Yu und Kaper, 1992). Somit ist im Einklang mit Befunden aus anderen Pathogenen, die das Typ III Sekretionssystem enthalten, der Typ III Sekretionsapparat hochkonserviert, die putativen Effektorproteine hingegen unterscheiden sich bereits zwischen EHEC und EPEC, so dass möglicherweise hierin unterschiedliche Pathogenitätsmechanismen zu begründen sind (Ismail et al. 1998).

Insgesamt heben sich die LEE-Sequenzen aus EHEC und EPEC durch einen niedrigeren G+C-Gehalt (40.91% bzw. 38.36%) gegenüber dem übrigen K-12-Genom (50.80%) hervor (Perna et al. 1998). Rechnet man den putativen Prophagen in LEE EDL933 nicht ein, so erhält man für EHEC EDL933 einen G+C-Gehalt von 39.59% (Perna et al. 1998). Dies ist ein starker Hinweis auf einen horizontalen Transfer der Pathogenitätsinsel. EHEC und EPEC sind nach *mdh*-phylogenetischen Untersuchungen, in denen die starke Konservierung des Malat-Dehydrogenase kodierenden Gens als Maß für die phylogenetische Verwandtschaft herangezogen wird (Pupo et al. 1997; Boyd et al. 1994), relativ weit miteinander verwandt; vielmehr gibt es etliche nicht-pathogene *E. coli* ohne LEE-Sequenz, die in engerer verwandtschaftlicher Beziehung zu EHEC bzw. EPEC stehen (Perna et al. 1998). Zusammen mit dem Befund von Wieler et al., dass sowohl EHEC- als auch EPEC-Stämme existieren, die eine andere Insertionsstelle als den *hot spot selC-yicK* aufweisen (Wieler et al. 1997), deutet sich hier an, dass die Pathogenitätsinsel eher lateral ausgetauscht oder parallel erworben worden ist, als dass ein mehrfacher Verlust verschiedener Linien unabhängig voneinander erfolgte (Perna et al. 1998).

5.6.9. Regulation der Virulenzfaktoren

Die koordinierte Aktivierung von Genen in Antwort auf Umweltstimuli ist eine weit verbreitete Eigenschaft von Mikroorganismen, um ihren *Status quo* zu optimieren und möglichst Energie für die Produktion nicht benötigter Produkte einzusparen. Insbesondere gilt dies für Mikroorganismen, die im Laufe ihres Zyklus mehrere Nischen besetzen und dadurch einem Prozess stetiger Anpassung unterliegen. Die vorzeitige Expression von Virulenzfaktoren kann sogar zu für die Mikroorganismen katastrophalen Folgen führen (Akerley et al. 1995). Daher finden sich für die Expression von Pathogenitätsfaktoren oftmals komplexe, verschachtelte Regulationskaskaden, die dafür Sorge tragen, dass die Faktoren sinnvoll hintereinandergeschaltet am richtigen Ort zur richtigen Zeit exprimiert werden (Mekalanos, 1992; Finlay und Falkow, 1997).

Bis auf Studien zur Expression von STx (s. 5.6.3.) wurde über die Regulation der in EHEC kodierten Virulenzfaktoren bislang nichts beschrieben. Das analoge A/E auslösende System in EPEC unterscheidet sich signifikant von EHEC durch die verschiedenen Virulenzplasmide. In EPEC erfolgte eine maßgebliche Regulation der Virulenzfaktoren sowohl auf pEAF (z.B. *bfp*) als auch *intrans* auf LEE_{EPEC} über das Megaplasmid kodierte *per*-Operon (Tobe et al. 1996; Gomez

Duarte und Kaper, 1995). PerA/BfpT ist ein AraC homologer transkriptioneller Aktivator und weist 31% Identität zum Regulatorprotein VirF aus *S. flexneri* auf. Der *per*-Locus aktiviert sowohl das *bfp*-Operon, als auch die Expression von *eaeA* (Intimin), *espB* und die Proteinsekretion (Kenny und Finlay, 1995; Puente et al. 1996; Tobe et al. 1996; Gomez Duarte und Kaper, 1995). Die Überexpression des *per*-Locus führt zur Übersekretion von mindestens 20 Proteinen (Tobe et al. 1996). Hingegen verweist das Fehlen des *per*-Locus in EHEC auf eine alternative Möglichkeit zur Regulation bzw. das Fehlen einer Regulationsebene der homologen Virulenzfaktoren des LEE.

Für die Expression der BFP wurden externe Stimuli bestimmt: Ca^{2+} induzierte die Expression, da Ca^{2+} -freie Medien zu einer 40% igen Reduktion führten und andere bivalente Kationen keinen Einfluß aufwiesen; Konzentrationen $>20 \text{ mM NH}_4^+$ reduzierten die Expression, wohingegen andere N-Quellen (Harnstoff, Na_2NO_2 , Na_2NO_3) keinen Einfluß auf die Expression ausübten (Puente et al. 1996). Die Expression erschien in DMEM mit Zugabe von 0.45% Glucose optimal zu sein (Puente et al. 1996). Andere Studien bezogen sich vielmehr auf die Sekretionseffizienz als auf die tatsächlich transkriptionell bestimmenden Elemente. So fanden Kenny et al. (Kenny et al. 1997a), dass EPEC EspB in gesteigertem Maße unter Bedingungen sekretierte, die den Bedingungen des gastrointestinalen Traktes ähnelten: pH 6.35 - 7.6, 36°C (die Sekretion ist signifikant reduziert bei 33°C oder 39°C), millimolare Konzentrationen an Ca^{2+} , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ und NaHCO_3 . Osmolarität schien ein weiterer regulativer Faktor zu sein, und bedeutend für die Sekretion war auch die Wachstumsphase. Die Sekretion wurde in der frühen logarithmischen Phase ($\text{OD}_{600}=0,2$) induziert und war maximal in der mittleren logarithmischen Phase ($\text{OD}_{600}=0,4$), wobei sie bis zur frühen stationären Phase konstant blieb. Die induktiven Bedingungen für die Sekretion von Proteinen in EPECs scheinen damit im Gegensatz zur Expression und Sekretion von Virulenzfaktoren anderer intestinaler Pathogene zu stehen. Inv- und Yst- Proteine aus *Yersinia* werden in der frühen stationären Phase induziert (Pepe et al. 1994; Mikulskis et al. 1994), und sekretierte Proteine aus *Salmonella* erfahren maximale Sekretion bei niedrigem Sauerstoffgehalt, hoher Osmolarität und einem alkalischen pH-Wert (Bajaj et al. 1996). Die unterschiedlichen Bedingungen zur Induktion von Virulenzfaktoren reflektieren möglicherweise die Anpassung der pathogenen Bakterien an verschiedene Nischen im Wirtssystem (Kenny et al. 1997a).

In vitro spielt die Kohlenstoffquelle ebenfalls eine Rolle in der Sekretion von Virulenzfaktoren aus EPEC E2348/69 und sukzessive in der Ausprägung des Phänotyps einer lokalisierten Adhäsion (Vanmaele und Armstrong, 1997). Das Wachstum von EPEC in Galaktose inhibierte eine nachfolgende Infektion an HEp2-Zellen, und anschließendes Waschen und Infektion in Medium mit einer anderen Kohlenstoffquelle regenerierte die Fähigkeit zur Adhäsion nicht. Dies korrelierte mit der Feststellung, dass die Expression von Intimin und BfpA im Wildtyp-Stamm EPEC E2348/69 nach Präinkubation in Galaktose-Medium drastisch reduziert war und dem Level in einer EPEC-Mutante ohne Megaplasmid ähnelte (Vanmaele und Armstrong, 1997). Unter induktiven Bedingungen hingegen wiesen adhärente Bakterien eine höhere Menge an Intimin und BfpA auf als nicht-adhärente Bakterien (Vanmaele und Armstrong, 1997). Bakterien, die in einem Medium mit Zusatz von Glucose, Fructose oder Mannose präinkubiert wurden, adhärten in gewohnter Weise an HEp2-Zellen, was darauf schließen ließ, dass die Adhäsion von EPEC nicht durch Mannose-sensitive Typ I-Pili vermittelt wurde.

6. Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, neue Virulenzfaktoren aus EHEC zu identifizieren und ihre Rolle im Pathogenitätsprozess sowie die unterliegende Regulation aufzuklären.

Einen Ansatz hierzu lieferte die für EPEC bekannte Sequenz des sekretierten Virulenzfaktors EaeB (EspB). Nach Klonierung und Sequenzierung dieses Gens aus EHEC sollte die zwischen *eaeA* und *espB* gelegene auch für EPEC unbekannte Nukleotidsequenz (in EPEC etwa 4.4 kb) kloniert und charakterisiert werden. Es war zu erwarten, dass darin enthaltene Gene zur Pathogenität von EHEC beitragen würden, da sie sich auf einer essentiellen Pathogenitätsinsel (LEE) befanden. Die Bedeutung der putativen Virulenzfaktoren sollte durch Bestätigung ihrer Expression, durch Generation von *in frame*-Deletionsmutanten ohne polare Effekte und von Komplementationsmutanten, durch deren Charakterisierung mittels *in vitro* Zellkultur-Assays, durch Lokalisation sowie durch die Analyse ihrer genetischen Organisation und Regulation der Expression untersucht werden.

II. MATERIALUNDMETHODEN

1. Bakterienstämme, Plasmide und eukaryontische Zelllinien

1.1. Bakterienstämme

In dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp/Serotyp	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>endA1 recA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) supE44 thi-1 gyrA96 Φ80d lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169d⁻</i>	Woodcock et al. 1989
<i>E. coli</i> CC118(λ pir)	Δ (ara-leu) araD Δ lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1 λ pir	Herrero et al. 1990
<i>E. coli</i> GM37	Wildtyp-Stamm	Hulton et al. 1990
<i>E. coli</i> GM230	<i>E. coli</i> GM37 hns ⁻	Hulton et al. 1990
<i>E. coli</i> MC4100	F ⁻ Δ (argF-lac) U169 araD139 rpsL150 ptsF25 flb5301 rbsR deoC relA1	Lange und Hengge-Aronis, 1991
<i>E. coli</i> RH90	<i>E. coli</i> MC4100 rpoS359::Tn10	Lange und Hengge-Aronis, 1991
<i>E. coli</i> GM48	F' thr, leu, thi, lacY, galK, galT, ara, fhuA, tsx, dam, dcm, supE44	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
<i>E. coli</i> INV α F'	F' endA1 recA1 hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Φ 80 lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR λ ⁻	Invitrogen
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , lac ⁻ , ara ⁻ , gal ⁻ , mtl ⁻ , F ⁻ , recA ⁺ , uvr ⁺	Qiagen
<i>E. coli</i> S17-1(λ pir)	Tp ^R Sm ^R recA thi pro hsdR ⁻ M ⁺ RP4:2- Tc:Mu:KmTn 7 λ pir	de Lorenzo et al. 1993
<i>E. coli</i> SM10(λ pir)	thi-1 thr leu tonA lacY supE recA ::RP4-2- TC::Mu λ pir Km ^r	Miller und Mekalanos, 1988
<i>E. coli</i> XL1-Blue	endA1 recA1 hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac [F' pro AB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 Tet ^r]	Stratagene
EHECEDL933	Prototypischer EHEC Stamm Serotyp O157:H7	O'Brien et al. 1983
EHECE32511/0	EHEC Serotyp O157	Willshaw et al. 1985
EHECE32511/0 Nal ^R	Nal ^R spontanes Nal-resistentes Derivat von E32511/0	diese Arbeit
STEC413.89-1	STEC Serotyp O26:H ⁻ von Kalb	Wieler et al. 1996
EHECEDL933 Δ pas	EHEC EDL933 Derivat mit einer Deletion in pas	in-frame diese Arbeit
EHECEDL933 Δ pas [pKSC2]	Komplementationsmutante von EDL933 Δ pas mit pas-Gen	EHEC diese Arbeit
EHECEDL933 Δ sepL	EHEC EDL933 Derivat mit einer Deletion in sepL	in-frame diese Arbeit

EHECEDL933 $\Delta sepL$ [pAKSK79]	Komplementationsmutante von EDL933 $\Delta sepL$ mit pAKSK79	EHEC	diese Arbeit
EHECEDL933 $\Delta espA$	EHEC EDL933 Derivat mit einer Deletion in <i>espA</i>	<i>in-frame</i>	diese Arbeit
EHECEDL933 $\Delta espD$	EHEC EDL933 Derivat mit einer Deletion in <i>espD</i>	<i>in-frame</i>	diese Arbeit
EHECEDL933 $\Delta espD$ [pANK84]	Komplementationsmutante von EDL933 $\Delta espD$ mit IR _{EDL933}	EHEC	diese Arbeit
EPECE2348/69	Prototypischer EPEC Stamm		Donnenberg et al. 1990

1.2. Plasmide

Tab. 2: Plasmide

Plasmid	Genotyp	Herkunft oder Referenz
pQE30	Ap ^R , Expressionsvektor	Qiagen
pCR2.1;pCRII	Ap ^R , Km ^R , <i>high-copy-number</i> Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
pMAK700oriT	Cm ^R , thermosensitiver Suizidvektor für positive Selektion	Viret et al. 1996
pANK1	Cm ^R , Km ^R , pMAK700oriT-Derivat mit MCS in der <i>HindIII</i> -Schnittstelle und <i>aph-A3</i> -Kassette	diese Arbeit
pANK84	Ap ^R , Km ^R , pCR2.1-Derivat mit IR _{EDL933}	diese Arbeit
pAKSK78	pANK84-Derivat mit Sequenz von 3'-Ende bis 5'-Ende <i>espD</i>	<i>eaeA</i> diese Arbeit
pAKSK79	pANK84-Derivat mit Sequenz von 3'-Ende bis 5'-Ende <i>espA</i>	<i>eaeA</i> diese Arbeit
pANK198	Ap ^R , pQE30-Derivat mit <i>pas</i> _{EDL933}	diese Arbeit
pANK214	Ap ^R , Km ^R , pCRII-Derivat mit <i>espB</i> _{EDL933}	diese Arbeit
pANK111	Cm ^R , Km ^R , pANK1-Derivat mit $\Delta espA$ _{EDL933}	diese Arbeit
pANK70	Ap ^R , Km ^R , pCRII-Derivat mit $\Delta espD$ _{EDL933}	diese Arbeit
pANK155	Cm ^R , Km ^R , pANK1-Derivat mit $\Delta espD$ _{EDL933}	diese Arbeit
pANK117	Ap ^R , Km ^R , pCR2.1-Derivat mit $\Delta sepL$ _{EDL933}	diese Arbeit
pANK157	Cm ^R , Km ^R , pANK1-Derivat mit $\Delta sepL$ _{EDL933}	diese Arbeit
pANK212	Ap ^R , pQE30-Derivat mit <i>sepL</i> _{EDL933}	diese Arbeit
pANK194	Ap ^R , Km ^R , pCR2.1-Derivat mit <i>pas</i> _{EDL933}	diese Arbeit
pANK203	Ap ^R , pQE30-Derivat mit <i>espA</i> _{EDL933}	diese Arbeit
pANK82	Ap ^R , Km ^R , pCR2.1-Derivat mit $\Delta espA$ _{EDL933}	diese Arbeit
pANK225	Ap ^R , pQE30-Derivat mit <i>espB</i> _{EDL933}	diese Arbeit
pANK226	Ap ^R , Km ^R , pCR2.1-Derivat mit <i>espA</i> _{EDL933}	diese Arbeit
pANK209	Ap ^R , Km ^R , pCR2.1-Derivat mit <i>espD</i> _{EDL933}	diese Arbeit
pUJ9TT	Ap ^R , multicopy promotor probe Vektor für Genfusionen	<i>lacZ</i> - Junnitz et al. 1998
pUJ3	Ap ^R , pUJ9TT-Derivat mit einem 653 bp PCR-Produkt der Primer <i>EspA-lac1</i> / <i>EspA-lac2</i>	<i>Bam</i> HI- diese Arbeit
pUJ3-285	Ap ^R , pUJ9TT-Derivat mit einem 371 bp	diese Arbeit

	<i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment aus pUJ3 in der <i>SmaI/BamHI</i> -Schnittstelle	
pANK181	Ap ^R , Km ^R , pCR2.1-Derivat mit Δ <i>pas</i> -Fragment	diese Arbeit
pKSC1	Cm ^R , pMAK700oriT-Derivat mit Δ <i>pas</i> _{EDL933}	diese Arbeit
pKSC2	Ap ^R , Km ^R , pCR2.1-Derivat mit <i>pas</i> -Fragment für die Komplementation von EHEC EDL933 Δ <i>pas</i>	diese Arbeit

1.3. Eukaryontische Zellen

Tab.3: Verwendete eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Herkunft oder Referenz
HEp-2	menschliches Larynx-Karzinom	ATCC CCL23
HeLa	menschliches Gebärmutter-Karzinom	ATCC CCL2
J774-A1	monocytischer Makrophage aus der Maus	ATCC TIB67

2. Chemikalien, Enzyme und andere Materialien

2.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland), die verwendeten Lösungsmittel von der Firma J. T. Baker (Deventer, Niederlande), die Restriktionsenzyme von New England Biolabs (NEB; Schmalbach, Deutschland) und die Medien von Difco (Detroit, MI, USA) bezogen.

Tab.4: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
(L-)Cystein	Sigma
(L-)Glutaminsäure	Sigma
(L-)Prolin	Sigma
[α - ³² P]dCTP	Amersham-Buchler, Braunschweig
4-Nitrophenylphosphat	Sigma
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid (30%:0,8%)	Roth, Karlsruhe
Agarose NEE Ultra-Qualität	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Ampicillin	Merck
AMV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Bromphenolblau	Merck
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Casaminosäuren	Sigma
Chloroform	Sigma

Cloramphenicol	Serva, Heidelberg
Chromatographiepapier 3MM	Whatman, Maidstone, England
Coomassie R-250 Brilliant Blue	Sigma
CTAB (Hexadecyl-trimethylammoniumbromid)	Fluka, Deisenhofen
DeazaG/A ^{T7} Sequencing Mixes Kit	Pharmacia, Uppsala, Schweden
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
Dextranulfat	Sigma
Diethylether	Merck
DIG11-ddUTP	Boehringer, Mannheim
Dipyridil	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
dNTPs (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)	MBI Fermentas, Litauen
DTT (Dithioerythritol)	Gibco
EDTA (Ethylenediamintetraacetat)	Serva
Entwickler für Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Essigsäure p.a.	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Ficoll 400	Sigma
Fixierer für Röntgenfilme	Kodak
Formamid	Merck
Formaldehyd (37%)	Merck
Gentamicin	Sigma
Glutaraldehyd (25%)	Sigma
Gluthation	Sigma
Harnstoff	Riedel-deHaën, Seelze
Heringssperm-DNA	Gibco
Imidazol	Applichem, Darmstadt
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	BioRad
Isopropanol	Merck
Kanamycin	Sigma
Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm	Kodak
Latexbeads	Sigma
MacConkey-Agar	Difco
β -Mercaptoethanol	Merck
MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Sigma
NADH	Sigma
Natriumsarkosylat	Fluka
NBT (Nitro-Blau Tetrazoliumsalz)	Sigma
Nicotinsäure	Sigma
Phenol/TE	Roth
Phenol/Chloroform (Rotiphenol/Chloroform)	Roth
Phosphorsäure (85%)	Merck
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Ponceau-S	Sigma
Puck's Saline	Gibco
Riboflavin	Merck
RNase Erase	ICN Biomedicals, Ohio, USA
RNasin	Promega
Salzsäure, rauchende	Merck
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka

Sorbitol	Fluka
Streptomycin	Sigma
TCA (Trichloressigsäure)	Fluka
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth
Tetracyclin	Sigma
Triton X-100	Merck
Tween 20	Merck
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid)	Roth
Xylencyanol	Serva
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Merck
Chromatographiepapier 3MM	Whatman
Nick-Sephadex G-50 Säulen	Pharmacia

2.2. Membranen

Tab.5: Membranen

Membran	Hersteller
Biodyne B Transfer Membrane	Pall GmbH, Dreieich
Immobilon P	Millipore, Eschborn
Filter Typ HA0,45 μ m	Millipore
VS-Filter 0,025 μ m	Millipore
Pure Nitrocellulose Membrane	Sartorius, Göttingen

2.3. Enzyme

Tab.6: Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase (AP)	Boehringer
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Boehringer
DNase I-RNase frei	Boehringer
Klenow-Enzym	New England Biolabs
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma
Ribonuklease (RNase A)	Sigma
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs

2.4. Kommerzielle Kits

Tab. 7: Kits

Kit-Bezeichnung	Hersteller
5'/3' Race Kit	Boehringer
Exo III Deletion Kit	Pharmacia
DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (mit CSPD)	Boehringer
DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit	Boehringer
DIG-DNA Labeling Kit	Boehringer
DNA Silver Staining Kit	Pharmacia
ECL Western Blotting Kit	Amersham-Buchler
Expand High Fidelity PCR System	Boehringer
GeneAmp PCR Reagent Kit	PerkinElmer, Weiterstadt
Genomic DNA Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Jetsorb Gel Extraction Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Jetstar Plasmid Midi Kit 50	Genomed
Original TA-Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Boehringer
Prime-It II Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Heidelberg
QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen
Qiagen Genomic-tip 100/G, Genomic DNA Bufferset	Qiagen
Qiagen Spin Plasmid Kit	Qiagen
Rediprime II Random Prime Kit	Amersham-Buchler
S.N.A.P. Total RNA Isolation Kit	Invitrogen
Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, CA, USA

2.5. Kommerzielle Antikörper und Seren

Tab. 8: Verwendete kommerziellerwerbliche Antikörper und Seren

Nummer	Beschreibung	Hersteller
	fötales Kälberserum (FCS)	Gibco
AS-anti-O157	anti-O157 Antiserum	Behring, Marburg
B1c	Fluorescein-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova
B4c	Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova, Hamburg
A4c	Peroxidasekonjugiertes Ziege-anti-Maus IgG+IgM (H+L)	BioRad
A2c	Rhodamin-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	Dianova
	Rhodamin-konjugiertes Phalloidin	Medac, Hamburg

2.6. Nicht-kommerzielle Antikörper und Seren

Monoklonale Antikörper gegen sekretierte Proteine von STEC wurden von Frank Ebel, Justus Liebig Universität Gießen bezogen. Polyklonale Antikörper gegen Pas_{EDL933} und SepL_{EDL933} wurden im Rahmen dieser Arbeit erzeugt.

Tab.9: Verwendete nicht-kommerziellerwerbliche Antikörper und Seren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
mAbB1	monoklonaler Maus-anti-EspA _{EDL933} Antikörper	Ebeletal. 1998
mAbB145	monoklonaler Maus-anti-EspA _{STEC413} Antikörper	Ebeletal. 1998
mAbA289	monoklonaler Maus-anti-EspB _{STEC413} Antikörper	Ebeletal. 1996
mAb-anti-EspD	monoklonaler Maus-anti-EspD _{STEC413} Antikörper	F. Ebel *
mAbB51	monoklonaler Maus-anti-EspE _{STEC413} Antikörper	Deibeletal. 1998
AS-anti-Pas _{EDL933}	polyklonaler Maus-anti-Pas _{EDL933} Antikörper	diese Arbeit
AS-anti-SepL _{EDL933}	polyklonaler Kaninchen-anti-SepL _{EDL933} Antikörper	diese Arbeit

*Dieser Antikörper wurde nicht veröffentlicht.

2.7. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden in der Abteilung DNA-Synthese der GBF oder von der Firma Gibco synthetisiert.

Tab.10: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Referenz
ANK17	CGTCGACTTTTGGCAGAGAACC	diese Arbeit
ANK36	GTGGATCCCCAGGCTTAGCCCTTCAATCGTTTC	diese Arbeit
ANK37	CGTACCGCCCCGGGCGTTATCTTCCGTACCTAG	diese Arbeit
ANK38	CCCGGGGCGGTACGATGAAGAATCCAAC	diese Arbeit
ANK39	GTGGATCCCACCCCGGCTAAAATATGTATTG	diese Arbeit
ANKA291	GTGAGTTTCCAATGGCTAATGG	diese Arbeit
ANKA292	GGATCCCGGGAGCAGCTTCTCGATTGTCG	diese Arbeit
ANKA293	GAAGCTGCTCCCGGGATCCGATAGTGAGCAGA GAGAGAATG	diese Arbeit
ANKA294	CATCTTTTGTGCCGTGGTTGAC	diese Arbeit
KSC _{eaeA}	CAGACATCTAGTGAGCAGC	diese Arbeit
KSC1	GTGTATTTCCCATCCTGCAACTCC	diese Arbeit
KSC2	CTTGATATACGTGAGGAAGGTGTTTTC	diese Arbeit
EHEC-hly1	GAGCGAGCTAAGCAGCTTG	F. Ebel
EHEC-hly5	CCTGCTCCAGAATAAACCACA	F. Ebel
ANK8111	AAATCGCCATTCGTTGACTACTTCT	diese Arbeit
ANK8112	TGCCATTCTGGCAACTCGCGATGCA	diese Arbeit
ANK8113	CAGTCGTCACTCACTGGTTTCATCA	diese Arbeit
ANK8114	GGATATTCTCCCCACTCTGACACC	diese Arbeit
ANK7191	GCTTTATTCTGGCTCTCAAAAACG	diese Arbeit
ANK25	CCGGATCCGGTATCCAGAAGATCAAGAAGC	diese Arbeit
ANKA289	CAACCCGGGCTAAGGACATCCTCAGCAGC	diese Arbeit

ANKA288	CACGTTCTGATGTGCAATCTC	dieseArbeit
ANK22	CCGGATCCCGTTATCTTCCGTACCCTAGC	dieseArbeit
ANK9952	CCGCCTTCACTGTTTGCAGATCACC	dieseArbeit
ANK9953	GAATTCCGTCTTGAGGAAGTTTGGCTTTCGC	dieseArbeit
ANK9954	CGCTTTCTGCATCGCACTGGATGCC	dieseArbeit
ANK9955	GAATTCCAGCAACACTTTCGTAGCCTTGACC	dieseArbeit
ANK10	GCAGGATCCATGGCTAATGGTATTG	dieseArbeit
ANK11	GCAGGTACCTCAAATAAATTCCTCCTTATA	dieseArbeit
ANK49	GCAGGATCCATGTTATCCTCATATAAAATAAAC	dieseArbeit
ANK50	CCAGGTACCTTAATACGACAGTGGAATATG	dieseArbeit
ANK14	CCAGGATCCATGGATACATCAAATGCAAC	dieseArbeit
ANK15	CGTGGTACCTTATTTACCAAGGGATATTGC	dieseArbeit
ANK6556	CGCGGATCCATGAATACTATCGAT	dieseArbeit
ANK6377	CGGGGTACCAACGTATCGACCATGATCAA	dieseArbeit
ANK9185	GCGGCCCGTCACTATGAGTGACCTG	dieseArbeit
ANK9186	CTTCGACATCGACGATCAGTGCACGTTCTGATG TGCAATC	dieseArbeit
ANK9187	GATCGTCGATGTCGAAGAACTCG	dieseArbeit
ANK9188	GGCGGATCCCGGGTATCGATTGTCTGAAG	dieseArbeit
ANK9189	GCTATCCCTATCTCTCTCAGG	dieseArbeit
AE19	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA	(Gannonetal.1993)
ANK56	ATGAAYATYCARCCRACYATYCARTCHGG	dieseArbeit
ANK57	CCDGAYTGRATRGTYGGYTGRATR TTC	dieseArbeit
ANK4	CAAAACGTAAC TGCCGAT	dieseArbeit
ANK5	G TAGCACCAATCACGCTC	dieseArbeit
ANK17	CGTCGACTTTTGGCAGAGAACC	dieseArbeit
ANK6	GCCAAACATCGCCAAAGTAGG	dieseArbeit
ANK18	GCAAACATCGCCAAAGTAGG	dieseArbeit
ANK19	CGTAAGAGTAAGCAGCAGCTCTTGC	dieseArbeit
ANK8	CAGACTCGAGACTTTCTGCGC	dieseArbeit
ANK9	GTGACCATCATCATCATTTGCTG	dieseArbeit
ANK16	CTTTATTTGCAACCTCAGAAGCC	dieseArbeit
FAB56	CATCTATATACCTCTTGATAATTT	F.Beltrametti

3. Nährmedien,Supplemente,LösungenundPuffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Komponenten in deionisiertem Wasser gelöst. Die Nährmedien wurden vor Verwendung 20 min bei 121°C autoklaviert und nach Abkühlen auf etwa 50°C mit den angezeigten Supplementen versetzt. Feste Medien wurden durch den Zusatz von 2% (w/v) Agar zur Nährlösung hergestellt. In Selektionsmedien wurden die in 3.3. angegebenen Antibiotika eingesetzt.

3.1. Nährmedien für Bakterien

Zum Einstellen der Konzentrationen wurde durch eine Milli-Q-Anlage (Millipore, Neu-Isenburg) aufgereinigtes Wasser (H_2O_{M}) wie angegeben verwendet.

Schafserythrocyten-Agar mit gewaschenen Schafserythrocyten dienten zur Kontrolle der hämolytischen Eigenschaft eines Stammes und wurden in Form fertig gegossener Petrischalen von Oxoid (Basingstoke, England) bezogen.

MacConkey-Agar (Difco) wurden nach den Angaben des Herstellers angesetzt.

Sorbitol-MacConkey-Agar (SMAC) wurde mit MacConkey-Agar nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50°C durch die Zugabe von 1% (w/v) Sorbitol hergestellt.

SOC-Medium

2	%	Trypton
0,5	%	Hefeextrakt
10	mM	NaCl
2,5	mM	KCl
10	mM	MgCl ₂
10	mM	MgSO ₄
20	mM	Glucose

Eine aus 1 mM MgCl₂ und 1 mM MgSO₄ hergestellte 1 mM Mg²⁺-Stammlösung wurde sterilfiltriert und wie die sterilfiltrierte 2 M Glucose-Stammlösung jeweils 1:100 dem autoklavierten Teilmedium hinzugefügt.

Luria-Bertani (LB)-Medium, Sambrook et al. (1989)

10	g	NaCl	
5	g	Hefeextrakt	
10	g	Trypton	
ad 1000	ml	H ₂ O	pH 7,5

Mineralmedium M9, Sambrook et al. (1989)

12,8	g	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	
3	g	KH ₂ PO ₄	
0,5	g	NaCl	
1,0	g	NH ₄ Cl	
4,0	g	Glukose	
ad 1000	ml	H ₂ O _M	pH 7,4

X-Gal-Medium

LB-Medium mit den folgenden Zusätzen:

75	µg/ml	Ampicillin
1	ml/l	0,1 M IPTG
2	ml/l	2% (w/v) X-Gal (in N,N'-Dimethylformamid)

DMEM

Die Puffer-Konzentration von DMEM mit 25 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure) wurde zur Erhöhung der Sekretionseffizienz der Esp-Proteine durch Zugabe von 20 g/l HEPES (pH 7,4) auf 0,1 M HEPES erhöht.

Kohlenstoffquellen

Glucose wurde als Stammlösung in einer Konzentration von 20% (w/v) in H_2O gelöst und in einer Endkonzentration von 0,2-0,5% (v/v) eingesetzt.

Sucrose wurde als Stammlösung in einer Konzentration von 10% (w/v) in H_2O gelöst und in einer Endkonzentration von 0,2-5% (v/v) eingesetzt.

3.2. Nährmedien für eukaryontische Zellen

Für die Anzucht von HeLa-Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, MEM oder DMEM ohne HEPES mit dem Zusatz von 50 ml FCS und 5 ml 200 mM Glutamin auf 500 ml Medium verwendet. Das Zellkulturmedium wurde vor Gebrauch stets auf 37°C vorgewärmt.

3.3. Selektionsmarker

Die in Tab. 11 angezeigten verwendeten Stammlösungen wurden sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Tab.11: Verwendete Selektionsmarker

Selektionsmarker	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin (Ap)	100mg/ml	H_2O	100µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	30mg/ml	Ethanol (96%)	30µg/ml
Gentamicin (Gen)	10mg/ml	H_2O	100µg/ml
Kanamycin (Km)	50mg/ml	H_2O	150-200µg/ml
Nalidixinsäure ¹ (Nal)	20mg/ml	H_2O	20µg/ml
Streptomycin (Sm)	100mg/ml	H_2O	100µg/ml
Tetracyclin (Tc)	12,5mg/ml	Ethanol (50%)	12,5µg/ml

¹ Nalidixinsäure wurde durch Titration mit NaOH gelöst.

3.4. Lösungen und Puffer

Die Bestandteile wurden in H_2O gelöst und der pH-Wert eingestellt.

10xPBS (Phosphat-gepufferte Saline)

80	g/l	NaCl
2	g/l	KCl
14,3	g/l	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
2	g/l	KH_2PO_4

pH 7,4

Der pH-Wert lag bei 7,4 und wurde nicht weiter verändert.

50xTAE

242	g/l	Tris-Base	
57,1	ml/l	Essigsäure	
100	ml/l	0,5MEDTA(pH8,0)	pH8,0

10xTBE

121,1	g/l	Tris-Base	
55	g/l	Borsäure	
40	ml/l	0,5MEDTA(pH8,0)	pH8,3

10xTBS (Tris-gepufferteSaline):

117	g/l	NaCl	
60,6	g/l	Tris-Base	pH7,6

TBS-T

TBSundZugabevon			
0,5	ml/l	Tween20	

TE-Puffer

10	mM	Tris-HCl	
1	mM	EDTA	pH8,0

10xMOPS

0,2	M	MOPS	
0,05	M	Na-Acetat	
0,01	M	EDTA	pH7,0

DieLösungwurdemiteinem45µmFiltersterilfiltriert.

20xSSC

3	M	NaCl	
0,3	M	Na ₃ -Citrat	
			pH7,0

4. KultivierungundLagerungvonZellen**4.1. KultivierungundStammkonservierungvonBakterien**

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in den unter 3.1. beschriebenen Nährmedien. Soweit nicht anders angegeben, wurden die verschiedenen Stämme in LB-Medium kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 30°C oder 37°C und 150rpm im Schüttler inkubiert.

Zur kurzfristigen Lagerung wurden Bakterien spätestens nach 3 Wochen auf frische Agarplatten überimpft. Allerdings bewahrten STEC-Stämme im Kühlschrank bedeutend länger ihre Vitalität im Vergleich zu *E. coli* K12-Stämmen.

Zur Herstellung von Stammkulturen zur langfristigen Lagerung wurde ein über Nacht bei indizierter Temperatur auf LB-Agar (ggf. mit Selektionsmarker) angewachsener Bakterienrasen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und dann bei -70°C eingefroren.

Einfriermedium

1	% (w/v)	Casaminosäure
10	% (v/v)	Glycerin

Alternativ wurden die Bakterien in 25% (v/v) Glycerin aufbewahrt. Dafür wurden Zellen über Nacht bei entsprechender Temperatur in LB-Medium (ggf. mit Selektionsmarker) angezogen. Jeweils 750 µl der ausgewachsenen Kultur wurden mit 250 µl sterilem Glycerin versetzt und in einem Schraubdeckelröhrchen (InterMed Nunc) bei -70°C gelagert.

Zur Reaktivierung eines konservierten Stammes wurde ein Ausstrich auf einer LB-Platte (ggf. mit Selektionsmarker) vorgenommen.

4.2. Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Gewebekulturschalen in einem Zellkulturbrutschrank – wie unter 3.2. angegeben – in MEM oder DMEM mit 10% (v/v) FCS und 5% (w/v) Glutamin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und nach Bildung eines Monolayers wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde nach Absaugen des Mediums mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,5 mg/ml Trypsin, 0,2 mg/ml EDTA in modifizierter "Puck's Saline") so lange inkubiert, bis sich die Zellen durch vorsichtiges Spülen leicht vom Boden der Petrischale ablösen ließen. Aliquots wurden in neue Gewebekulturschalen mit 20 ml Zellkulturmedium überführt.

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen einer konfluent gewachsenen Platte nach dem Ablösen in 40 ml Medium aufgenommen und 5 min bei 900 rpm abzentrifugiert (GPR-Zentrifuge, Beckman). Die pelletierten Zellen wurden in 4 ml FCS mit 8% (v/v) DMSO resuspendiert und in 500 µl Aliquots in einem Einfrierautomaten auf -120°C abgekühlt (Firma Cryosom; Standard Einfrierprogramm für Lymphozyten; im Durchschnitt -2°C pro Minute). Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Reanimierung wurden ein Aliquot im 37°C warmen Wasserbaderwärmt und in vorgewärmtes Medium überführt.

5. Bakterientypisierung

Nach einer erfolgten Konjugation oder Transformation, bei der als Rezipient ein STEC-Stamm diente, wurde in der Regel das Vorliegen des rekombinanten Stammes mittels schneller Typisierungsmethoden bestätigt. Hierzu gehörten der Nachweis der Shigatoxin-Gene *stx1* und *stx2* und der Nachweis des extrachromosomalen *hly*-Gens durch PCR-Amplifikation spezifischer Sequenzbereiche (s. Primer, Tab. 10), Koloniefärbung auf Sorbitol-MacConkey-Agar oder Rainbow-Agar™ (s. Tab. 12), hämolytische Aktivität auf gewaschenen Schafserythrocyten-Agarplatten (s. 3.1.) und die Reaktivität mit einem O157-spezifischen Antiserum (s. 2.5.).

Tab. 12: Koloniefärbung auf Sorbitol-MacConkey (SMAC)-Agar und Rainbow-Agar™

Bakterienstamm	Färbung der Kolonien	
	SMAC-Agar	Rainbow-Agar™
EHEC EDL933	farblos	blaulila
EHEC E32511/0	farblos	blaulila
EHEC HUS-2	lila	lila schwarz/Rand farblos
EHEC 102-9	lila	violett
STEC H19	lila	purpur
STEC 413.89-1	lila	lila schwarz-blaulila
<i>E. coli</i> SM10(λ pir)	farblos	violett
<i>E. coli</i> S17-1(λ pir)	lila	farblos

6. Arbeiten mit Bakterien und Zellkulturen

6.1. Infektion von Zellkulturen

Zur Infektion eukaryontischer Zellen mit STEC-Stämmen wurden HeLa-Zellen verwendet. Für immunfluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Analysen wurden diese 15–18 h vor der Infektion mittels Anfärbung mit Trypanblau und anschließender lichtmikroskopischer Auszählung mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer auf eine Lebendzellzahl von etwa 5×10^4 /ml eingestellt und jeweils 1 ml in 24-well Nunc lon Delta Zellkulturplatten (InterMed Nunc) mit 12 mm-Deckgläschen (InterMed Nunc) ausgesät. Die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht führte zu etwa 1×10^5 Zellen pro Vertiefung. Für Ultradünnschnitte infizierter Zellen dienten konfluent bewachsene Petrischalen. Die Bakterien wurden über Nacht in LB-Medium angezogen, dann 1/20 in DMEM mit 100 mM HEPES verdünnt und bei 37°C in 5% CO₂ ohne Schütteln für etwa 3 h angezogen, bis eine OD₆₀₀ $\approx 0,7$ erreicht war. Die Infektion erfolgte durch die Inokulation aus dieser Bakterienkultur mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 100 Bakterien/Zelle. Während der Infektion wurden die Ansätze mehrmals, jedoch frühestens nach 1½ h, vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 500 µl Zellkulturmedium aufgefüllt, um ein Überwachsen und die Akkumulation cytotoxischer Produkte durch die Bakterien zu verhindern.

6.1.1. Immunfluoreszenzmikroskopie

Nach erfolgter Infektion wurden die auf Deckgläschen gewachsenen HeLa-Zellen durch Zugabe von 500 µl PBS mit 3,7% Formaldehyd pro Vertiefung für mindestens 60 min im Kühlschrank fixiert, zweimal vorsichtig in PBS gewaschen, für 2 min mit 500 µl 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und anschließend zweimal vorsichtig in PBS gewaschen. Die Inkubation mit den ersten Antikörpern erfolgte für 30 min bei 37°C mit jeweils 20 µl in PBS gelösten Antikörper, wobei die Zellkultur überständen der monoklonalen Hybridomazellen 1:10, die übrigen Antikörper i.d.R. 1:100 verdünnt wurden. Mit den zweiten Antikörpern und/oder konjugiertem Phalloidin (1:100) wurde nach zweimaligem Waschen in PBS entsprechend inkubiert und gewaschen. Die Fixierung der Deckgläschen erfolgte schließlich, indem ein Tropfen Mowiol/DABCO auf die Deckgläschen gegeben und diese umgedreht auf einen Objektträger gelegt wurden. Die Versiegelung der Deckgläschenränder erfolgte mit Nagellack.

6.1.2. Rasterelektronenmikroskopie

Die HeLa-Zellen wurden wie oben beschrieben auf Deckgläschen infiziert, jedoch in Cacodylat-Puffer mit 3% (v/v) Glutaraldehyd und 5% (v/v) *p*-Formaldehyd auf Eis fixiert, mit PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert und einer Kritischen-Punkt-Trocknung mit CO₂ (CPD030, Bal-Tec, Liechtenstein) unterzogen. Die Proben wurden abschließend mit einem 10 nm-Goldfilm bedampft (SCD040, Balzers, Liechtenstein) und in einem Zeiss DSM 982 Gemini Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (Leo, Oberkochen) untersucht.

Cacodylat-Puffer

0,1	M	Cacodylat
0,01	M	MgCl ₂
0,01	M	CaCl ₂

pH 6,9

6.1.3. Transmissionselektronenmikroskopie

Die HeLa-Zellen wurden, wie unter 6.1. beschrieben, angezogen, infiziert und, wie unter 6.1.2. beschrieben, mit Cacodylat-Puffer fixiert. Die Postfixierung wurde für 60 min in Cacodylat-Puffer mit 1% (w/v) wässrigem OsO₄ durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit einer ansteigenden Acetonreihe (10, 30 und 50% [v/v]) entwässert. Eine In-block-Kontrastierung mit 2% (w/v) Uranylacetat in 70% (v/v) Aceton über Nacht schloß sich an. Nach vollständiger Entwässerung in 90% und 100% (v/v) Aceton wurden die Proben über Nacht in einer Mischung aus 1 Teil Aceton und 1 Teil Spurr-Harz inkubiert, gefolgt von 1:2 Aceton:Spurr-Harz für weitere 8h. Abschließend wurden die Proben in reines Spurr-Harz, mit mehrmaligem Wechsel, überführt. Nach Polymerisation für 8h bei 70°C in Gelatine kapseln wurden die Proben angefräst und Ultradünnschnitte mit einem Glasmesser (Ultracut S, Leica, Bensheim) hergestellt. Die Ultradünnschnitte wurden auf Formvar beschichteten 300-mesh Kupfer Grids gesammelt, mit Uranylacetat für 30 min bei 40°C und anschließend mit Bleicitrat für 3 min bei 20°C mittels eines Ultrastainers (Leica, Bensheim) nachkontrastiert. Die Untersuchung der Ultradünnschnitte

erfolgte mit einem Zeiss EM 910 Transmissionselektronenmikroskopes (Leo, Oberkochen) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV bei kalibrierten Vergrößerungen.

6.1.4. Quantitative Bestimmung der Adhärenz von EHEC an HeLa-Zellen

1×10^5 /well HeLa-Zellen wurden wie unter 6.1. beschrieben in 24-well Platten ohne Deckgläschen ausgesät und über Nacht angezogen. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 100:1 Bakterien/HeLa-Zelle bis zu 6 h. Die HeLa-Zellen wurden mehrfach vorsichtig mit PBS gewaschen, bis keine freien Bakterien zu sehen waren. Das PBS wurde abgesaugt und die HeLa-Zellen wurden durch Zugabe von $450 \mu\text{l}$ 0,25% (w/v) Triton X-100 lysiert. Es wurde sorgfältig gespült, das Lysat in $50 \mu\text{l}$ 10x PBS überführt und gevortext. Danach wurden Verdünnungsreihen angefertigt und die Anzahl der CFU (*colony forming unit*) nach Ausplattieren mit einem Spiral Plater (Modell 3000, BIO-SYS, Karben) auf LB-Platten und Inkubation über Nacht bei 37°C bestimmt. Alle Testreihen wurden mindestens doppelt ausgeführt, jeder Verdünnungsansatz jeweils zweimal ausplattiert.

6.1.5. Quantitative Bestimmung der Invasivität von EHEC in HeLa-Zellen

1×10^5 /well HeLa-Zellen wurden wie unter 6.1. beschrieben in 24-well Platten ohne Deckgläschen ausgesät und über Nacht angezogen. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 100:1 Bakterien/HeLa-Zelle für 3,5 h. Der Überstand wurde abgesaugt und durch Zellkulturmedium mit $100 \mu\text{g/ml}$ Gentamicin ersetzt und weiter im Zellkulturbrutschrank inkubiert, so daß die extrazellulären Bakterien abgetötet wurden. Nach festgelegten Zeitintervallen wurde der Überstand einer Probe abgesaugt, die HeLa-Zellen mit PBS gewaschen und mit $450 \mu\text{l}$ 0,25% (w/v) Triton X-100 lysiert. Es wurde sorgfältig gespült, das Lysat in $50 \mu\text{l}$ 10x PBS überführt und gevortext. Danach wurden Verdünnungsreihen angefertigt und die Anzahl der CFU nach Ausplattieren mit einem Spiral Plater auf LB-Platten und Inkubation über Nacht bei 37°C bestimmt. Als Kontrolle über die Effizienz von Gentamicin wurden Mediumüberständen nach Gentamicin-Inkubation unverdünnt ausplattiert. Alle Testreihen wurden mindestens doppelt ausgeführt, jeder Verdünnungsansatz jeweils zweimal ausplattiert.

6.1.6. Bindungsstudien mit gekoppelten Latexbeads

Die Kopplung von Proteinen an Latexbeads wird unter 7.1.1. beschrieben.

Die Proteine gekoppelten beads wurden in dieser Arbeit nur qualitativ eingesetzt. Daher genügte es, das gleiche Volumen an beads je Ansatz einzusetzen. Es wurden je $20 \mu\text{l}$ und $100 \mu\text{l}$ gekoppelte beads in well seiner in 24-well Plates angezogenen Übernachtskultur mit HeLa-Zellen (s. 6.1.) pipettiert und für 3 h bei 37°C und 5% CO_2 im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde mit 3,7% (w/v) *p*-Formaldehyd in PBS für 1 h fixiert und die Deckgläschen, wie in 6.1.1. beschrieben, für die Immunfluoreszenz oder, wie in 6.1.2. beschrieben, für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet und analysiert.

7. Arbeiten mit Proteinen

7.1. Gesamtzellextrakt

Die schnelle Lyse diente dem Nachweis von Proteinen, die nicht ins Medium sekretiert wurden. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und in einem adäquaten Volumen H_2O aufgenommen und für 10 min bei $95^\circ C$ erhitzt. Die Zelltrümmer wurden durch 3minütige Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge pelletiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erfolgter Proteinbestimmung wurden 20 μg Protein mit dem gleichen Volumenteil SDS-Probenpuffer vermischt und zur Analyse auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

SDS-Probenpuffer

60	mM	Tris-HCl, pH 6,8
10	%	Glycerin
2	%	SDS
5	%	β -Merkaptoethanol
0,01	%	Bromphenolblau

7.2. Zellaufschluß mittels French Press

EHEC EDL933 ließ sich sehr schlecht mittels Ultraschall aufschließen. Daher wurde der Zellaufschluß mittels French Press gewählt. Diese Art des Zellaufschlusses ermöglicht die Gewinnung bakterieller Proteine, die nicht integrierter Bestandteil der Membran sind. Der Vorteil dieser Methode ist, daß keine Detergenzien für den Zellaufschluß verwendet werden müssen, was eine nachfolgende Aufreinigung erleichtert bzw. für die weitere Verarbeitung notwendig sein kann. Zur Vermeidung von Kontaminationen von Arbeitsmaterial durch EHEC außerhalb des Sicherheitslabors wurden die Bakterien für mindestens 1 h in 300 $\mu g/ml$ Gentamicin abgetötet. Ein Kontrollausstrich nach der Inkubationszeit sowie die Lagerung der French Press Einheit in 70% (v/v) Ethanol für mindestens einen Tag sorgten für zusätzliche Sicherheit. Für den Zellaufschluß wurden die Bakterienkulturen (100-1000 ml) pelletiert, das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in 3 ml Sonication buffer aufgenommen. Die Zellen wurden in eine auf $4^\circ C$ vorgekühlte 3 ml-French Press Einheit gefüllt und zweimal hintereinander in der French Press (SLMAMINCO, Model FA-078-E1) bei 900 PSI aufgeschlossen. Die Zelltrümmer und die unlöslichen Einschußkörperchen wurden anschließend durch Zentrifugation des Extraktes für 20 min bei $4^\circ C$ und $13000 \times g$ pelletiert und Pellet sowie Überstand wurden bis zur weiteren Verwendung in Aliquots bei $-20^\circ C$ getrennt gelagert.

Sonication buffer

50	mM	Na-Phosphat, pH 8,0
300	mM	NaCl

7.3. Fraktionierungen

Zur Auftrennung von Proteinen in Bezug auf ihre Topologie in verschiedenen zellulären Kompartimenten wurden Bakterien bzw. eukaryontische Zellen fraktioniert.

7.3.1. Fraktionierung von Bakterien

Die Zellfraktionierung von *E. coli* erfolgte nach den Angaben von Murray (Murray, 1981). Die Bakterien wurden unter induzierenden Bedingungen in 100 ml Medium angezogen, durch die Zugabe von 300 µl/ml Gentamicin/ml Zellkultur abgetötet und 60 min bei 4000 x g pelletiert. Der Kulturüberstand konnte für die Analyse der sekretierten Proteine weiterbehandelt werden (s. 7.3.3.). Das Pellet wurde in 3 ml 10 mM HEPES-Puffer, pH 7,4 aufgenommen und mit einer French Press aufgeschlossen (s. 7.2.). Das Lysat wurde für 5 min bei 5000 x g oder für 30 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet (Zelltrümmer) bei -20°C eingefroren. Der Überstand der Zentrifugation wurde für 1 h bei 200.000 x g in einer Ultrazentrifuge (TL-100, Beckmann, München) aufgetrennt, das Pellet auf Eis aufbewahrt und der Überstand für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand wiederum für 1 h bei 200.000 x g abzentrifugiert und der Überstand (Proteine aus Cytoplasma und Periplasma) bei -20°C gelagert. Die Pellets beider Ultrazentrifugationsschritte wurden nach Resuspension in 200 µl 10 mM HEPES-Puffer, pH 7,4 vereinigt. Nach der Zugabe von Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 20 mg/ml und Mischen wurde die Suspension für 1 h bei 30.000 x g zentrifugiert. Das Pellet beinhaltet die Proteine der äußeren Membran, der Überstand enthielt die Proteine der inneren Membran und beide Proben wurden bei -20°C gelagert.

7.3.2. Isolierung periplasmatischer Proteine

Periplasmatische Proteine wurden nach der Methode von Donohue-Rolfe (Donohue-Rolfe und Keusch, 1983) isoliert. Die Bakterienkultur wurde mittels Zentrifugation pelletiert, dreimal mit 10 mM Tris, pH 7,4 gewaschen und in 1/10 des Ausgangsvolumens in 25 mM PBS, pH 7,4 mit 0,14 M NaCl aufgenommen. Dann wurden 2 mg/ml Polymyxin B hinzugefügt und die Suspension nach vorsichtigem Mischen 5 min unter leichtem Rühren auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde zweimal zentrifugiert, der Überstand abgenommen und über Nacht gegen 20 mM PBS, pH 7,4 dialysiert. Aliquots wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

7.3.3. Fraktionierung von HeLa-Zellen

Die Fraktionierung von Zellkulturen zur Detektion intrazellulärer oder membranständiger bakterieller Proteine wurde von Wolff et al. beschrieben (Wolff et al. 1998). Es wurde allerdings auf die Isolierung des Gesamtzellextraktes des Inokulums verzichtet, da die Expression eines Proteins bereits durch seine Sekretion in den Kulturüberstand des Inokulums kontrolliert wurde. HeLa-Zellen wurden wie unter 6.1. beschrieben in Ø 9 cm-Petrischalen angezogen (1 x 10⁷ Zellen) und mit 'aktivierten' Bakterien für 6 h infiziert. Dann wurden 2 ml Zellkulturüberstand abgenommen, die darin enthaltenen Proteine mit TCA gefällt (s. 7.4.) und das Protein-Pellet in 100 µl SDS-Ladepuffer gelöst (sekretierte Proteine). Die HeLa-Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS gekratzt und für 2 min bei 1600 x g zentrifugiert. Zur Lyse der HeLa-Zellen, nicht aber der adhärennten Bakterien wurde das Pellet in 900 µl H₂O_M aufgenommen und 3 min inkubiert. Danach wurden 100 µl hinzugefügt und die Suspension für 15 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Die Proteine des Überstandes wurden mit TCA gefällt (s. 7.4.) und in 50 µl SDS-Ladepuffer gelöst (Proteine des Cytosols). Das Pellet der zentrifugierten Suspension wurde in 150 µl 1% (v/v) Triton X-100 in PBS resuspendiert, für 5 min bei 23.000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen (Proteine der eukaryontischen

Cytoplasmamembran). Das Pellet wurde in 100 µl SDS-Ladepuffer aufgenommen und enthielt die unlösliche Fraktion (Nuklei, cytoskeletale Proteine, Proteine adhärenter Bakterien).

Eine parallel in 24-well Platten angesetzte Infektionsreihe diente zur Kontrolle der Infektionseffizienz.

7.4. Sekretierte Proteine

Um die Sekretion von Proteinen zu verstärken, wurden in LB-Medium gewachsene Übernachtskulturen von EHEC 1/20 in DMEM mit 100 mM HEPES für etwa 3 h angezogen, bis eine $OD_{600} \approx 0,7$ erreicht war. Nach Pelletierung der Bakterien wurden die im Überstand vorhandenen Proteine durch die Zugabe von 10% (v/v) TCA über Nacht bei 4°C gefällt und bei 4000x g für 60 min abzentrifugiert. Das luftgetrocknete Proteinpellet wurde in 1/500 des Ausgangsvolumens in 1,5 M Tris (pH 8,8) aufgenommen und einer Proteinbestimmung unterzogen. Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

7.5. Methanol-Fällung von Proteinen

Um gering konzentrierte Proteine aus einer Suspension für die SDS-PAGE schnell und effizient zu fällen, wurde eine Methanol-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde folgender Ansatz gemischt:

100	µl	Proteinlösung
+400	µl	Methanol
+100	µl	Chloroform
+300	µl	H ₂ O _M

Der Ansatz wurde 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, die obere Phase vorsichtig abgenommen (Interphase enthält Proteine), erneut 300 µl Methanol zugegeben und gemischt. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

7.6. Isolierung von His-Tag-Fusionsproteinen

Die Anzucht Protein überexprimierender Bakterien wurde im allgemeinen nach Anleitung des Herstellers (Qiagen) bei 30°C durchgeführt. Der Aufschluß der Bakterien erfolgte mittels einer French Press (s. 7.2.) und das Lysat wurde bis zur Proteinisolierung bei -20°C gelagert.

Vor Anzucht und Isolierung in größerem Umfang wurden Vorversuche durchgeführt, wie der Hersteller im Handbuch vorschlägt. Hierzu gehörte das Screening von exprimierenden Bakterien im kleinen Maßstab und die Überprüfung der Lokalisation und Solubilität der überexprimierten Proteine.

Bei der Isolierung der Fusionsproteine wurde ebenfalls nach Anleitung vorgegangen. Hierbei wurde ein Bettvolumen von 2 ml Ni-NTA-Material eingesetzt und es wurde eine Econo-column Pumpe (BioRad) verwendet. Proteineluate wurden photometrisch bei 280 nm mit einem UV-Detektor (2238 Uvicord SII, LKB-Pharmacia) gemessen. Die Fraktionen wurden manuell als 10 ml Fraktionen (Durchfluß, 1. Waschen, weitere Waschschritte bei Bekanntsein des Elutionsvolumens) oder als 1 ml Fraktionen (bei Austesten des Elutionsvolumens, Fusionsprotein-Eluat) aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE

analysiert und positive Fraktionen wurden vereinigt. Nach Konzentrationsbestimmung (s. 7.7.) wurde die Proteinlösung aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

7.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Verwendung vergleichbarer Proteinmengen wurden die Konzentrationen von Proteinlösungen i.d.R. biochemisch quantifiziert.

7.7.1. Biochemische Quantifizierung

Proteinbestimmungen wurden mit dem Roti-Nanoquant-System (Roth) in Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden jeweils $160\mu\text{l}$ des angesetzten $1\times$ Reagenzes vorgelegt und mit $40\mu\text{l}$ Proteinlösung einer Verdünnungsreihe ergänzt. Nach 10 min Inkubation erfolgte die Proteinmessung mit Hilfe des "Emax precision microplate reader" (MWG Biotech) und des SoftmaxPro Software (V 1.20 für Windows, Mol. Dev. Corp., USA) bei einer Differenz der Wellenlängen $590\text{ nm} - 405\text{ nm}$. Die Eichgerade wurde bei jeder Messung erneut aus BSA-Lösungen von $50\mu\text{g/ml}$ bis $500\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit Hilfe der Programme Excel oder SoftmaxPro errechnet.

7.7.2. Photometrische Quantifizierung

Die Möglichkeit der Detektion von Proteinen mittels UV-Licht bei 280 nm wurde qualitativ bei der Aufreinigung von Fusionsproteinen (s. 7.6.) genutzt, hierbei war jedoch die effektive Konzentration nebensächlich. Die photometrische Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde allerdings bei der Messung der DNA-Reinheit (s. 9.2.3.) mitgeführt oder bei Proteinlösungen durchgeführt, wenn dies nicht anders meßbar war.

7.7.3. Abschätzung im SDS-Polyacrylamidgel

Präzipitierte Proteine eigneten sich durchaus noch für Anwendungen wie z.B. Western Blots. Die Konzentration der nach der Dialyse präzipitierten Proteine ließen sich jedoch nur unzuverlässig durch photometrische Quantifizierung oder mittels des Roti-Nanoquant-Systems (s. 7.7.1.) bestimmen. Daher wurden mehrere Verdünnungen der Probe einer geeichten Reihe verschiedener BSA-Konzentrationen durch SDS-PAGE (s. 7.8.1.) und anschließender Coomassie-Färbung gegenübergestellt und daran die ungefähre Konzentration der Probe festgestellt.

7.8. Nachweis von Proteinen

7.8.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Herstellung der vertikalen Gele und der anschließenden Elektrophorese wurden Minigelapparaturen (Biometra, Göttingen) verwendet. Bis auf TEMED wurden die Reagenzien für das Trenngel zusammengegeben und gut durchmischt. Der Start der Polymerisation erfolgte nach Zugabe von TEMED und das Gemisch wurde bis etwa $1,5\text{ cm}$ unterhalb der kleineren Glasplatte gegossen. Zur Begradigung der Geloberfläche wurde das noch nicht polymerisierte Gel mit 70% (v/v) Ethanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Ethanol dekantiert. Das Sammelgel wurde in gleicher Weise angesetzt und über das Trenngel gegossen.

Zur Formung der Geltaschen wurde ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt. Die Gele wurden entweder direkt nach der Polymerisation eingesetzt oder nach Abnahme der Halteklammern in nasse Papiertücher eingewickelt und in einer verschlossenen Schale bis zu mehreren Tagen bei 4°C aufbewahrt.

Nach Montage der Gelplatten an das Biometra System wurde der SDS-Laufpuffer in die Vorratskammern gefüllt und die Kämmen vorsichtig entfernt. Die zu testenden Proteinproben wurden im gleichen Volumen SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt, um sie vollständig zu denaturieren. Unmittelbar vor Auftragung der Proben wurden die Geltaschen mit Puffer gespült. Die Elektrophorese im Anschluß an die Auftragung sämtlicher Proben erfolgte bis zum Einwandern der Farbbänder in das Trenngel bei 20 mA/Platte, anschließend bei 40 mA/Platte. Die Elektrophorese wurde i. d. R. bis zum Austreten der Bromphenolblaubänder aus dem Gel durchgeführt. Danach wurde das Gel entweder mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (s. 7.8.2.) oder für andere Anwendungen weiterbehandelt. Als Molekulargewichtsstandard dienten vorgefärbte Proteinstandards der Firma BioRad. Die Größen der einzelnen Standardproteine konnten von batch zu batch des Herstellers variieren und relevante Größen sind daher stets bei den SDS-Gel-Abbildungen vermerkt.

Trenngel-Puffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Sammelgel-Puffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Trenngel für 4 Gele

Gelstärke	7,5%	10%	12,5%	15%
H ₂ O	12ml	10ml	7ml	5,8ml
Trenngel-Puffer	6ml	6ml	6ml	6ml
Acrylamid	6ml	8ml	11ml	12,2ml
10% (w/v) SDS	240µl	240µl	240µl	240µl
10% (w/v) APS	32µl	32µl	32µl	32µl
TEMED	32µl	32µl	32µl	32µl

Sammelgefäß für 4 Gele**für alle Gelstärken**

H ₂ O	7,2ml
Sammelgel-Puffer	1,28ml
Acrylamid	1,32ml
10% (w/v) SDS	100µl
10% (w/v) APS	50µl
TEMED	10µl

SDS-Probenpuffer

60	mM	Tris-HCl
10	%	Glycerin
1	%	SDS
1	%	β-Mercaptoethanol
0,01	%	Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer

25	mM	Tris, pH 8,3
200	mM	Glycin
0,1	%	SDS

7.8.2. Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde das Gel nach der Elektrophorese (s. 7.8.1.) für 1 h in Coomassiefärbelösung gefärbt und anschließend mehrere Stunden im Entfärber geschwenkt, bis der Hintergrund entfärbt war. Die gefärbten Gele wurden mittels des Densitometers GS-700 (BioRad) eingescannt und konnten mehrere Tage in H₂O unter Verschluss aufbewahrt werden.

Coomassiefärbelösung

1	g	Coomassie R-250 Blue
100	ml	Essigsäure
400	ml	H ₂ O
500	ml	Methanol

Entfärber

500	ml	Methanol
75	ml	Essigsäure
425	ml	H ₂ O

7.8.3. Western Blot Analyse

Die Proteine wurden mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (s. 7.8.1.) aufgetrennt und das SDS-Gel mindestens 20 min in Blotpuffer inkubiert. Für jedes Gel wurden 4 Whatman-Papiere und ein auf die Größe des Gels zugeschnittene Nitrocellulose-Membran mit inkubiert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte im Anschluß mittels der Semi Dry Blotting-Apparatur (BioRad) für 20 min bei 20 V. Hierfür wurden zwei Lagen in Blotpuffer getränktes Whatman-Papier blasenfrei auf die Kathode des Gerätes gelegt, hierauf wurde die äquilibrierte Membran, das äquilibrierte SDS-Gel und zwei weitere Lagen getränkten Filterpapiers ebenfalls luftblasenfrei platziert. Die Membran wurde nach dem Transfer direkt für den Nachweis der Proteine verwendet oder in PBS bei -20°C gelagert.

Blotpuffer

25	mM	Tris-HCl
192	mM	Glycin
20	%	Methanol

pH 8,3

Zum chemilumineszenten Nachweis der geblotteten Proteine wurde die Membran in PBS mit 30% Frischmilch (0,3% Fett) über Nacht bei 4°C und – wie alle folgenden Schritte – mit leichtem Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal für 10 min in PBS gewaschen und daraufhin mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit dem ersten Protein spezifischen Antikörper in PBS mit 10% Milch (Verdünnung 1:10 bis 1:2000) inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten für je 10 min in PBS wurde der zweite Antikörper (Horseradish Peroxidase gekoppelte Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-IgG und -IgM, BioRad) in 10% Milch in PBS verdünnt (1:2000) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Blot für jeweils 10 min in TBS-T, TBS-T mit 0,5 M NaCl, TBS-T mit 0,5% (v/v) Triton X-100 und TBS-T gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham), wobei die Entwicklung des Blots gemäß den Herstellerangaben erfolgte.

7.9. Protein-Protein-Interaktion

Um die Interaktion der aufgereinigten Proteine mit den sekretierten Proteinen zu analysieren, wurden diese sekretierten Proteine wie unter 7.3.3. beschrieben aufkonzentriert, durch SDS-PAGE aufgetrennt (7.8.1.) und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (s. 7.8.3.). Einzelne Spuren wurden abgeschnitten und individuell behandelt. Nicht-spezifische Bindungsstellen wurden mit 5% (w/v) BSA in PBS-Tween 20 (0,5%, v/v) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Dann wurden die Streifen über Nacht bei 4°C und – wie alle Schritte – unter leichtem Schwenken in 5% (w/v) BSA in PBS-Tween 20 (0,5%, v/v) mit aufgereinigtem Protein (s. 7.6.) oder isolierten Fraktionen aus EHEC EDL933 (s. 7.3.) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Streifen für 15 min bei Raumtemperatur in PBS-Tween 20 gewaschen, für 1 h bei Raumtemperatur wie oben geblockt und wieder gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem Protein spezifischen Antikörper erfolgte bei einer Verdünnung von 1:1000 für 1 h bei Raumtemperatur. Die Streifen wurden gewaschen und dann mit dem zweiten Antikörper (Horseradish Peroxidase gekoppelte Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-IgG und -IgM, BioRad) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Streifen wurden wie unter 7.8.3. beschrieben für die Detektion mit Chemiluminiszenz weiterbehandelt. Für die Detektion der sekretierten Proteine EspA_{EDL933}, EspB_{EDL933}, EspD_{EDL933}, und EspE_{EDL933} wurden einzelne Kontrollstreifen wie unter 7.8.3. beschrieben mit spezifischen monoklonalen Antikörpern behandelt (s. Tab. 9).

7.10. Protein-DNA-Interaktion

7.10.1. Gel-Retentionsanalyse

Die Untersuchung der DNA-Bindungskapazität anhand einer Mobilitätsänderung von Protein-DNA-Komplexen in Polyacrylamidgelen wurde in Anlehnung an die Empfehlungen von Parsek et al. (Parsek et al. 1994) durchgeführt. Einzelne PCR-Produkte wurden mit dem QIA Quick PCR Purification Kit von Oligonucleotiden und dNTPs gereinigt. Die Konzentration der DNA wurde innerhalb einer Versuchsreihe konstant gehalten. Da die DNA nicht-radioaktiv mit dem DNA-Silver Staining Kit detektiert werden sollte, wurde i.d.R. 1 µg DNA/Gel Spur eingesetzt, somit eine DNA-Menge unter 10 pmol. Die Konzentration an nativ aufgereinigtem Protein (s. 7.6.) wurde innerhalb einer Versuchsreihe variiert, so daß bei einer geringen Proteinkonzentration mit viel freier DNA, bei der höchsten Proteinkonzentration mit viel Protein-DNA-Komplex gerechnet werden konnte. Als Kontrollen wurden Gelspuren mit der höchsten eingesetzten Proteinkonzentration und mit DNA ohne Proteinzugabe aufgetragen. Lediglich die Proteinprobe wurde mit Beladungslösung mit Farbstoff versetzt. Die anderen Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Beladungslösung ohne Farbstoff vermischt.

Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend zügig auf ein 7,5% Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte im 4°C Kühlraum mit einer Spannung von 10 V/cm. Bei Verwendung von TE als Laufpuffer wurde der Puffer während des Laufes mehrfach gewechselt. Das Polyacrylamidgel wurde anschließend nach Angabendes Herstellers mit dem DNA Silver Staining Kit gefärbt.

7.10.2. South Western

Das Prinzip der South Western Analyse beruht auf der Detektion einer markierten DNA-Sonde, die an ein immobilisiertes Protein bindet. Dazu wurden Proteine mittels PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (s. 9.2.2.) und anschließend auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert (s. 7.8.3.). Danach wurde die Membran für 1 h in Sättigungspuffer geschwenkt und kurz in DNA-Bindungspuffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 3 h bei Raumtemperatur mit Inkubationspuffer, der die markierte DNA-Sonde enthielt. Die DNA-Sonde wurde mit Hilfe des Rediprime II Random Prime Kits (Amersham) mit [α -P³²]dCTP (s. 10.3.1.) markiert. Die Membran wurde anschließend dreimal in Sättigungspuffer gewaschen, in Folie eingeschlagen, exponiert und detektiert (s. 10.3.1. und 10.3.3.).

Sättigungslösung

10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
50	mM	NaCl
2	mM	EDTA
5	% (w/v)	BSA

DNA-Bindungspuffer

10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
50	mM	NaCl
2	mM	EDTA

Inkubationspuffer

DNA-Bindungspuffer mit		
20	µg/ml	Kompetitor-DNA (poly[I-C])
10 ⁶	cpm	5'-markierte DNA-Sonde

7.11. Kopplung von Proteinen an Latexbeads

Jeweils 50 µl fluoreszierende Latexbeads mit einem Durchmesser von 1,03 µm wurden zweimal in 1 ml PBS gewaschen und bei 2000 rpm abzentrifugiert. Danach wurden die beads in einer Proteinlösung in PBS resuspendiert. Das Resuspensionsvolumen hing von der Konzentration des Proteins ab und wurde auf etwa 200 µg Protein/Ansatz eingestellt. Die Eppendorf-cups wurden über Nacht bei 4°C langsam geschwenkt. Am nächsten Tag wurden die gekoppelten beads dreimal in 1,5 ml PBS gewaschen und in 200 µl PBS aufgenommen. Die Kopplungseffizienz wurde mittels eines FACS-Gerätes (Becton Dickinson, Belgien) bestimmt. Als Negativ-Kontrolle für die Kopplungseffizienz wurden nicht-gekoppelte beads mitgeführt. Als Negativ-Kontrollen für die Infektionen wurden mit BSA gekoppelte beads und nicht-gekoppelte beads eingesetzt.

7.12. β-Galaktosidase-Assay

Proben bakterieller Kulturen wurden in Zeitintervallen genommen, die OD₆₀₀ bestimmt und Aliquots davon wurden bei 8000 x g abzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren. Um die Promotoraktivität während einer Infektion an HeLa-Zellen zu testen, wurden die Monolayer infiziert (s. 6.1.) und in Zeitintervallen wurde der Überstand abgenommen und nicht-adhärenente Bakterien durch Zentrifugation bei 8000 x g pelletiert. Um adhärenente Bakterien zu erhalten, wurde dann wie unter 6.1.4. beschrieben verfahren. β-Galaktosidase-Assays wurden mit Hilfe des the β-GAL Reporter Gene Assay Chemiluminescent Kits nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei zu 500 µl Lysis-Puffer zusätzlich 20 µl Chloroform und 20 µl 0,1% (w/v) SDS zugegeben wurden. Die Lyse erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Die Proben wurden in einem Victor 1420 Multilabel Counter Fluorometer (EG&G WALLAC, Finnland) gemessen.

8. Arbeiten mit Antikörpern**8.1. Herstellung polyklonaler Antikörper**

Für die Herstellung von spezifischem Antiserum gegen Pas_{EDL933} wurden jeweils 50 µg aufgereinigtes Pas_{EDL933} (s. 7.6.) mit dem gleichen Volumen inkomplettes Freund'sches Adjuvans vermischt und intraperitoneal C57BL/6-Mäusen injiziert. Booster mit den gleichen

Mischungsansätze erfolgten nach jeweils 12 Tagen. Je Maus wurden 500 µl Post-Immuns Serum erhalten (AS-anti-Pas_{EDL933}). Prä-Immuns Serum dieser Mäuse war bereits vorhanden (PräAS-anti-Pas_{EDL933}). Die Seren wurden bei -20°C eingefroren.

Für die Herstellung von spezifischem Antiserum gegen SepL_{EDL933} wurden 4 Aliquots à 100 µg aufgereinigtes SepL_{EDL933} (s. 7.6.) an die Firma EuroGenTec (Seraing, Belgien) verschickt, wo ein Kaninchen immunisiert und geblutet wurde. Das erhaltene Prä-Immuns Serum (PräAS-anti-SepL_{EDL933}) und Post-Immuns Serum (AS-anti-SepL_{EDL933}) wurden bei -20°C eingefroren.

8.2. Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Die Protein spezifische Aufreinigung von Antiseren erfolgte mittels der Affinitätsaufreinigung über Membranen. Nach Auftrennung des aufgereinigten Fusionsproteins (s. 7.6.) mittels SDS-PAGE (s. 7.8.1.), wobei eine große Auftragungsstasche verwendet wurde, wurde das Protein auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (s. 7.8.3.) und mit Ponceau-Rot gefärbt.

Ponceau-Rot

20 g Ponceau-S
ad 100 ml 30% (w/v) TCA
Die Gebrauchslösung wurde 1:50 in H₂O angesetzt.

Das geblottete Protein wurde ausgeschnitten und für 2 h unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur mit 5% (w/v) Milchpulver in PBS geblockt. Danach wurde der Membranstreifen in unverdünntem Antiserum über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Membranstreifen wurde in TBS-T gewaschen und die Antikörper wurden mit 1 ml 0,2 M Glycin, pH 2,2 durch vorsichtiges Schwenken für 5 min bei Raumtemperatur gelöst. Die Neutralisation auf etwa pH 7,8 erfolgte sofort im Anschluß mit 83 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,5. Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

8.3. Konzentrationsbestimmung von Antikörpern mittels ELISA

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) wurde in 96-well-Mikrotiterplatten (Nunc MaxiSorp) durchgeführt. Als Antigen zur Beschichtung der Platten diente aufgereinigtes Fusionsprotein (s. 7.6.), das in 0,1 M NaHCO₃ (pH 9,6) auf 10 µg/ml verdünnt wurde. In jedes Well wurden 100 µl Proteinlösung gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit 0,05% Tween 20 in PBS gewaschen (Microplate Washer EL 403, Biotek), und freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 100 µl 10% FCS in PBS für 2 h bei 37°C blockiert. Nach drei Waschgängen wurden pro Well 100 µl der seriell in 15% FCS in PBS verdünnten Antiseren aufgegeben und weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Als Blindprobe dient eine Reihe Wells, in die statt Serum nur 15% FCS in PBS gegeben wurde. Der Nachweis gebundener Anti-Fusionsprotein-Antikörper erfolgte nach erneutem dreimaligen Waschen mit Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen Antikörpern (Dianova), die in 10% FCS in PBS verdünnt und für 1 h bei 37°C inkubiert wurden (100 µl/well). Folgende Antikörper wurden dabei eingesetzt: IgG (spezifisch für Fc Fragment), 1:4000 oder IgM (spezifisch für µ-Kette), 1:6000. Nach drei weiteren Waschgängen wurden pro well 200 µl Substratlösung zugesetzt und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 50

μl 2,5 M H_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei 490 nm (Referenz: 595 nm) in einem "MicroplateReader" (Bio-Rad, Modell 3550) gemessen.

Substratlösung (100 ml)

25	ml	0,1 M Zitronensäure
25	ml	0,2 M Na_2HPO_4
50	ml	H_2O_M
30	mg	o-Phenylendiamin
50	μl	30% (v/v) H_2O_2

Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt.

9. Arbeiten mit DNA

9.1. Isolierung und Aufreinigung von DNA

9.1.1. Mini- und Midipräparation von Plasmiden

Für die Plasmidisolierung zum Zwecke von Restriktionsverdau oder Transformation wurden 1,5 ml einer bakteriellen Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 6500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 100 μl Glucose/Tris/EDTA-Lösung resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 200 μl frisch angesetzter NaOH/SDS-Lösung. Nach maximal 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden zur Ausfällung von chromosomaler DNA und Proteinen 150 μl K-Acetat-Lösung hinzugegeben, die Suspension wurde gut durchgemischt und für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Präzipitat für 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen, mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und die Plasmid-DNA für 30 min bei -20°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 20 min wurde das Pellet in 200 μl 0,3 M Natriumacetat, pH 6,0 aufgenommen und mit 2 Voleis kaltem Ethanol vermischelt. Die Ausfällung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C für 30 min. Die gefällte DNA wurde für 20 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit je 0,5 ml eiskaltem 70% igen Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets in der Vakuumzentrifuge (Vacu-Speed DNA 110, Savant, Farmingdale, USA) wurde die DNA in 20 μl H_2O_M gelöst, mit 0,5 μl RNase A-Lösung versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Aliquots der DNA-Präparation wurden im Agarosegel kontrolliert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

Glucose/Tris/EDTA-Lösung

25	mM	Tris-HCl, pH 8,0
10	mM	EDTA, pH 8,0
50	mM	Glucose

NaOH/SDS-Lösung

0,2	M	NaOH
1	%	SDS

K-Acetat-Lösung

3 M Kaliumacetat, pH 4,8

RNase A-Lösung

20 mg/ml RNase A in

10 mM Tris

15 mM NaCl

pH 7,5

Die Lösung wurde 15 min bei 100°C aufgekocht.

Plasmid-Puffer

10 mM Tris-Base

10 mM NaCl

0,5 mM EDTA, pH 8,0

pH 8,0

Alternativ wurde für eine schnelle Isolierung von Plasmiden das "lysis by boiling" angewendet. Das Bakterienpellet aus 1,5 ml Übernachtskultur wurde in 350 µl STET aufgenommen.

STET

0,1 M NaCl

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

5 % (v/v) Triton X-100

Nach Zugabe von 25 µl einer frischen Lysozym-Lösung (10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) wurde die Suspension 3 s gevortext und für 60 s bei 95°C inkubiert. Das Lysat wurde für 15 min bei Raumtemperatur und 12.000 x g zentrifugiert und das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entnommen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 40 µl 2,5 M Na-Acetat (pH 5,2) und 420 µl Isopropanol hinzugefügt, gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 5 min präzipitiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Für die Sequenzierung von Plasmiden und für die Transformation von Plasmiden in EHEC-Stämme wurde die Plasmidaufreinigung mit dem Qiagen Spin Plasmid Kit gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

Plasmidisolierungen im Midi-Präp-Maßstab erfolgten mit dem Qiagen Midi Spin Plasmid Kit gemäß den Herstellerangaben.

9.1.2. Präparation genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit dem Genomic DNA Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

9.1.3. Reinigungsmittels Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Extraktion von Proteinen wurde die DNA-Suspension mit dem gleichen Volumen Tris-gesättigtes Phenol ausgeschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte 60 s bei 13000 rpm. Ebenso wurde der jeweilige Überstand einer Zentrifugation mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließend einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Der DNA-haltige Überstand wurde einer Ethanol-Fällung (s. 9.1.4.) unterzogen.

9.1.4. Ethanol-Präzipitation

Zum Ausfällen von DNA aus wässrigen Lösungen wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 6,5 und 2 Volumen 96% (v/v) Ethanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde 2 h bei -70°C inkubiert und die DNA 1 h bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, Vakuum getrocknet und anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

9.1.5. Reinigungsmittels Ultrafiltration

Für die Aufkonzentration oder Reinigung von DNA wurden Microcon-100-Gefäße (Amicon, Witten) eingesetzt. Dazu wurde die DNA-Lösung in ein Microcon-100-Gefäß überführt und mit H_2O auf 500 μl aufgefüllt. Das Gefäß wurde für 8 min bei 3000x g (6000 rpm) zentrifugiert und die DNA durch Zugabe von 500 μl H_2O gewaschen. Anschließend wurde das gewünschte Volumen H_2O auf die Membrane gegeben, der Membraneinsatz umgedreht in ein Eppendorfgefäß gesteckt und die DNA für 2 min bei 1000x g (3500 rpm) zentrifugiert. Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) laut Angaben des Herstellers.

9.1.6. Entsalzungsmittels Dialyse

Vor der Sequenzierung wurde die DNA entsalzt, indem die DNA-Lösung auf ein in einer Petrischale oder einem 24-Well Plate auf $\text{H}_2\text{O}_\text{M}$ schwimmenden Dialysefilter (Millipore VS-Filter, Porendurchmesser 0,025 μm) aufgetropft wurde. Nach 30 min Inkubation wurde die DNA-Lösung vorsichtig abpipettiert.

9.2. Analyse von DNA-Präparationen

9.2.1. Agarose-Gelelektrophorese (AGE)

Für routinemäßige Auftrennungen von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2% ige (w/v) Agarosegele in Tris/Acetate-EDTA (TAE) in Minigelkammern (Horizon 58, Gibco BRL, England) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumenanteil DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. DNA-Moleküle in Minigelen wurden in der Regel 30-45 min zwischen 80 und 150 V, in großen Gelen ca. 16 h bei 40 V aufgetrennt. Zur Färbung der DNA-Banden wurde das Gel 5-20 min in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g/ml}$) geschwenkt und danach der Hintergrund 10-15 min in H_2O entfärbt. Die DNA-Banden wurden bei 253 nm auf einem UV-Tisch (Herolab UVT 2020) detektiert und mit dem EASY-System (Herolab, Wiesloch) dokumentiert.

DNA-Ladepuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) XylencyanolFF

30 % (v/v) Glycerin

Die Komponenten wurden in 1 x TAE-Puffer gelöst.

9.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung sehr kleiner DNA-Fragmente (<500bp) oder von DNA-Protein-Komplexen (s. 7.10.1.) erfolgte in vertikalen Polyacrylamidgelen in Minigelapparaturen (Biometra, Göttingen). Die Herstellung der Gele wurde analog wie unter 7.8.1 beschrieben durchgeführt, jedoch wurde das denaturierende Detergenz SDS weggelassen. Die Proben wurden in 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer aufgenommen oder entsprechend abweichenden Angaben (s. 7.10.1.) vorbereitet und auf ein 5-20% iges Polyacrylamidgel in TBE-Puffer geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V.

Polyacrylamidgel

Gelstärke	5%	8%	12%	20%
H ₂ O	62,7ml	52,7ml	39,3ml	12,7ml
5xTBE	20ml	20ml	20ml	20ml
30% (w/v) Acrylamid	16,6ml	26,6ml	40ml	66,6ml
10% (w/v) APS	700µl	700µl	700µl	700µl
TEMED	35µl	35µl	35µl	35µl

9.2.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung wurden durch photometrische Messung der OD_{260nm} bzw. OD_{280nm} bestimmt. OD_{260nm} = 1 entspricht 50 µg dsDNA/ml bzw. 38,5-40 µg ssDNA/ml (Davis et al., 1980; Sambrook et al., 1989). Für reine DNA-Lösungen gilt OD_{260nm} : OD_{280nm} = 1,000 : 0,556. Niedrigere Quotienten signalisieren die Verunreinigung durch Proteine. Zur Ermittlung der DNA-Konzentrationen aus sehr geringen DNA-Mengen wurde eine Verdünnungsreihe der DNA-Lösung im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Der gerade noch durch Fluoreszenz bei UV-Licht sichtbare DNA-Konzentration wurde eine DNA-Menge von 2 ng zugeordnet.

9.2.4. Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Bestimmung der Größe eines DNA-Fragmentes erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Als Größenvergleich dient eine 1 kb-Leiter (NEB, Schwalbach) oder eine 100 bp-Leiter (NEB), die neben dem zu bestimmenden Fragment aufgetrennt wurde. Durch Vergleich der Wanderungsstrecken konnte die Fragmentgröße abgeschätzt oder mittels halblogarithmischer Auftragung der DNA-Fragmentgrößen der Marker-DNA gegen die Laufstrecke die Größe des zu bestimmenden DNA-Fragments genauer bestimmt werden.

9.3. Isolierung von DNA-Fragmenten

Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach erfolgter Auftrennung im Agarosegel und kurzer Anfärbung im Ethidiumbromidbad auf dem UV-Tisch ausgeschnitten mittels des Jetsorb Gel Extraction Kits (Genomed) gemäß den Angaben des Herstellers aus der Agarose aufgereinigt. Die Resuspension der DNA erfolgte in TE-Puffer.

9.4. Modifizierung von DNA

9.4.1. Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers unter Verwendung der empfohlenen Puffer. Ein Standardansatz enthielt:

DNA	0,3-2 µg
10x Restriktionspuffer	2 µl
Enzym (10 units/µl)	0,5-1 µl
ad 20 µl H ₂ O _M	

9.4.2. Dephosphorylierung von DNA

Um den Anteil rezirkularisierter Vektor-DNA nach einer Ligation zu verringern, wurde die enzymatische Abspaltung der endständigen Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Nach vollständiger Restriktion der DNA wurden 10 µl 10x Dephosphorylierungspuffer zugegeben und mit H₂O_M auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Der Ansatz wurde nach Zugabe alkalischer Phosphatase mit 0,5 U/µg DNA bei 5'-Überhängen oder 1 U/µg DNA bei 3'-Überhängen für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 0,5 µl alkalischer Phosphatase und Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch 10 min bei 55°C gestoppt. Der Ansatz wurde einer Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 9.1.3.) und anschließender Ethanol-Präzipitation (s. 9.1.4.) unterzogen.

9.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T₄-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers, wobei das zu klonierende DNA-Fragment in einem 2-4fach molaren Überschuß gegenüber dem Vektor zugegeben wurde.

9.5. Transfervon DNA in Bakterien

9.5.1. Herstellen und Transformation chemokompetenter Zellen

Chemokompetente Bakterien wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Hierfür wurde eine Übernachtskultur auf eine Anfangsdichte in LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker von OD₆₀₀ = 0,075 gebracht. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5. Die Bakterienkultur wurde in einem GSA-Rotor 5 min bei 4000 rpm (2610 x g) und 4°C pelletiert und in 30 ml eiskaltem Tfb I resuspendiert. Nach 90 min auf Eis wurde die Bakterien suspension für 4 min bei 3500 rpm (1460 x g) und 4°C in einem SS-34-Rotor pelletiert und in 4 ml eiskaltem Tfb II aufgenommen. Anschließend wurden Aliquots à 200 µl in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70°C gelagert.

TfBI

a)	30	mM	KAc
	10	mM	CaCl ₂ ·2H ₂ O
	15	%	Glycerin

b)	100	mM	RbCl
	50	mM	MnCl ₂ ·4H ₂ O

Die Lösungen a) und b) wurden mit Essigsäure auf pH 6,0 eingestellt.

Die Lösungen a) und b) wurden zu gleichen Teilen gemischt und sterilfiltriert. Unter Aluminiumfolie wird die fertige Lösung 3 Monate bei 4°C haltbar.

TfBII

	10	mM	MOPS, pH 7,0
	10	mM	RbCl
	75	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin

Die Lösung wurde aus sterilfiltrierten Stocklösungen frisch angesetzt.

Die Transformation chemokompetenter Zellen erfolgte nach Inkubation eines 200 µl Aliquots kompetenter Zellen mit 0,1–1 µg DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes für 30 min auf Eis durch Erwärmung des Ansatzes für 3–5 min in einem Wasserbad bei 42°C. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 5 min auf Eis gestellt. Um die Expression der Selektionsmarker zu ermöglichen, wurden 400 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten mit Selektivmedium plattiert. Die Bestätigung positiver Klone erfolgte durch PCR (s. 9.6.1.) oder Analyse der enthaltenen Plasmid-DNA (s. 9.1.1. und 9.4.1.).

9.5.2. Herstellen und Transformation elektrokompetenter Zellen

Elektrokompetente Bakterien wurden nach dem folgenden Protokoll hergestellt. 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur inokuliert und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 30 min auf Eis gekühlt und die Bakterien durch Zentrifugation in einem GSA-Rotor für 15 min bei 4000 rpm (2610 × g) und 4°C geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und die Bakterien zweimal in 100 ml sterilem eiskalten 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 200 µl eiskaltem GYT aufgenommen, in Aliquots à 40 µl in flüssigem N₂ schockgefroren und bei –70°C gelagert.

GYT

	10	%	Glycerin
	0,1	%	Hefe-Extrakt
	0,25	%	Trypton

Die Transformation elektrokompenter Zellen erfolgte nach Zugabe von 1–5 µl Ligationansatz zu einem Aliquot auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien. Das Gemisch wurde unter Ausschluß von Luftblasen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltbreite überführt. Die Transformation erfolgte mit dem Gene-Pulser und dem Gene-Puls-Controller (BioRad) durch einen elektrischen Impuls (25 µF, 2,5 V, 200 Ω). Sofort danach wurden 400 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt und die Suspension zur Regeneration und Expression plasmidkodierter Resistenzen für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten mit Selektivmedium plattiert. Die Bestätigung positiver Klone erfolgte durch kPCR (s. 9.6.1.) oder Analyse der enthaltenen Plasmid-DNA (s. 9.1.1. und 9.4.1.).

9.5.3. Transfer durch Konjugation

Der Transfer von Deletionsfragmenten enthaltenen Suizidvektoren wurde für die Steigerung der Effizienz des Transfers mittels Konjugation gemacht. Hierbei dienten *E. coli* S17-1 (λ_{pir}) als Donorstamm und EHEC 32511/0 NaI^R als Rezipient. Vor der Konjugation wurden Donor und Rezipient durch Ausstreichen auf Antibiotikum-enthaltendem Medium auf ihre Sensitivität gegenüber den Selektionsmarkern Chloramphenicol und Kanamycin überprüft. Donor und Rezipient wurden dann über Nacht in Flüssigmedium bei 30°C angezogen. Dabei wurde der Donor bei nur 60 rpm geschüttelt, um die für die Konjugation notwendigen Pili auf der Bakterienoberfläche nicht zu zerstören, wohingegen der Rezipient bei 120 rpm angezogen wurde. Jeweils 1 ml der Kulturen wurde am nächsten Morgen abzentrifugiert (Donor: 10 min bei 5000 rpm, Rezipient: 5 min bei 13000 rpm) und das Pellet zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Donor und Rezipient wurden im Verhältnis 1:3 vermischt und jeweils 100 µl auf einen Filter (Typ HA, 0,45 µm Porengröße, Millipore) getropft. Die Filter wurden über Nacht auf LB-Medium-Platten bei 30°C inkubiert. Um die Bakterien zu resuspendieren, wurden die Filter in 1 ml PBS gewaschen, die Suspension in PBS verdünnt und 50 µl der Verdünnungsstufen 10⁻¹ bis 10⁻⁴ wurden auf Mineralmedium-Platten mit 30 µg/ml Chloramphenicol und 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Die erhaltenen Konjuganten wurden auf eben solchen Mineralmedium-Platten vereinzelt und anschließend auf ihre Identität als EHEC mittels Amplifikation (s. 9.6.1.) eines *stx2*-Fragments und auf den Gehalt des Suizidvektors mit dem Deletionsfragment untersucht.

9.6. Polymerase-Chain Reaction (PCR)

9.6.1. PCR und Kolonie-PCR

Die PCR diente zur Amplifizierung von DNA zum Zwecke der Klonierung, Sequenzierung und dem Nachweis von Genotypen. Die Template-DNA für einen PCR-Ansatz wurde entweder durch Plasmidpräparation (s. 9.1.1.) gewonnen oder indem eine vereinzelt Bakterienkolonie in 500 µl H₂O_M resuspendiert, für 10 min bei 95°C inkubiert und abzentrifugiert wurde. Etwa 100 ng Plasmid-DNA aus der Plasmidpräparation, bzw. 10 µl des Lysatüberstandes wurden im PCR-Ansatz eingesetzt. Die spezifischen Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco (Gibco BRL, England) synthetisiert.

Für einen PCR-Ansatz wurden die Komponenten des GeneAmp® PCR Reagent Kit (Perkin Elmer) verwendet.

PCR-Ansatz

100	ng	Plasmid-DNA
oder 10	µl	Bakteriensuspension
20-25	pmol	je Primer
5	µl	10xPCR-Puffer
1	µl	dNTP-Mix (25mM/dNTP)
0,3	µl	Taq Polymerase
		ad 50 µl H ₂ O _M

Der Ansatz wurde gemischt und mit ca. 50 µl Mineralöl (Nujol, Perkin Elmer) für die Thermocycler-Reaktion in einem Thermocycler (Landgraf TC Varius V) überschichtet. Die Bedingungen der Thermocycler-Reaktion richten sich unter anderem nach der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer (Annealing-Temperatur ca. 5-10°C unterhalb T_m). Die Schmelztemperatur wurde hier nach folgender Faustregel berechnet (Sambrook et al. 1989):

$$T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$$

G, C, A, T: Anzahl der bindenden Nukleotide des verwendeten Oligonukleotids

Thermocycler-Reaktion

1. Segment (1 Zyklus): 94°C, 120s Denaturierung
2. Segment (25-30 Zyklen): 94°C, 20s Denaturierung
30-60s, Annealing-Temperatur (ca. 45-65°C)
72°C, 120s Extension
3. Segment (1 Zyklus): 72°C, 600s Extension
4. Segment (Hold): 15°C

Nach Abschluß der Reaktion wurde der PCR-Ansatz durch das Öl hindurch abgezogen und 5 µl zur Kontrolle im Agarosegel aufgetrennt. Zur Entfernung von Oligonucleotiden und dNTPs konnte die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt werden.

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit über 2 kb Länge wurden auf Grund des besseren Proofreadings der Pwo-Polymerase mit Hilfe des Expand Long Template PCR Systems oder des Expand High Fidelity PCR Systems durchgeführt. Diese PCR-Produkte bedurften einer gesonderten Behandlung für die direkte Klonierung (s. 9.6.4.).

9.6.2. Batch-Kolonie-PCR (B-kPCR)

Für das schnelle Screening vieler Klone auf einen bestimmten Genotyp wurden als Template für eine Kolonie-PCR nicht eine, sondern 5-10 Einzelkolonien in einem Reaktionsansatz analysiert. Positive Ansätze wurden dann an Hand einzelner PCR-Ansätze wiederholt untersucht.

9.6.3. Overlap Extension PCR (OE-PCR)

Zur Konstruktion von Deletionsfragmenten wurde die OE-PCR (Ho et al. 1989) angewandt. In einer ersten Reaktionsrunde wurden die Primer so gewählt, daß zunächst nur Carboxy- und Amino-Termini eines Gens mit angrenzenden Down- und Upstream-Regionen in zwei getrennten Ansätzen amplifiziert wurden. Einer der beiden Primer der internen Gensequenz enthielt eine vorangestellte komplementäre Nukleotidsequenz des respektiven zweiten Primers mit mindestens 16 bp überlappender Sequenz, so daß nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel (s. 9.2.1.) und Isolierung aus dem Gel (s. 9.3.) die Zusammenführung beider PCR-Produkte in einer zweiten PCR-Reaktionsrunde ein Fusions-Template aus beiden PCR-Produkten der ersten Reaktionsrunde entstehen konnte. Die verwendeten Primer dieser zweiten Reaktionsrunde waren die externen Primer der ersten Runde, so daß als PCR-Produkt nur amplifizierte DNA des Fusion-Templates erzeugt wurde. Lage und Größe der deletierten Gensequenz waren somit frei wählbar. Für eine nachfolgende effektive homologe Rekombination im Wildtyp-Stamm über die Klonierung in einen Suizidvektor war jedoch die Länge der zur Wildtyp-Sequenz homologen Bereiche im 5'- und 3'-Sequenzbereich auf mindestens 250 bp vorgegeben.

9.6.4. Klonierung von PCR-Produkten

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten, die mit Taq-Polymerase amplifiziert worden waren, erfolgte aus dem PCR-Reaktionsansatz in den High-Copy-Vektor pCRII bzw. pCR2.1 mit Hilfe des TA Cloning Kits (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Die PCR-Produkte konnten vorübergehend bei -20°C gelagert werden, ohne daß die Effizienz der Klonierung merkbar eingeschränkt war.

PCR-Produkte, die mit anderen DNA-Polymerasen amplifiziert worden waren, mußten durch das Anhängen von 3'-Adenin-Überhängen aktiviert werden. Hierzu wurden nach der PCR-Reaktion in einen PCR-Ansatz 1 U Taq-Polymerase und 1 µl 25 mM dATP hinzugefügt und für 10 min bei 72°C inkubiert. Die adenylierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QiaQuick PCR Purification Kits aufgereinigt und wurden wie oben beschrieben weiterprozessiert.

9.7. Unidirektionale Verkürzung durch ExoIII-Verdau

Um große DNA-Abschnitte relativ schnell und ohne hohen Kostenaufwand durch die Bestellung immer neuer Primer zu sequenzieren, bedient man sich der Methode der unidirektionalen Verkürzung (Henikoff, 1984). Ein Sequenziervektor mit einem zu sequenzierenden DNA-Insert wird zunächst durch den Verdau von zwei Restriktionsenzymen an einem Ende des Inserts linearisiert, so daß das entstehende Vektorende vor dem anschließenden Verdau durch ExoIII geschützt ist, während das Insert-Ende einem ExoIII-Verdau zugänglich ist. Dies erreicht man durch die Wahl geeigneter Restriktionsenzyme. Restriktionsenzyme, die 5'-Überhänge, *blunt ends* oder *nicks* erzeugen, generieren ExoIII sensitive Enden, während 3'- und 4-Basen-Überhänge nicht durch ExoIII verdaut werden können. Der ExoIII-Verdau des linearisierten Plasmides erfolgt in einem großen Ansatz, aus dem in Zeitintervallen Aliquots entnommen werden und darin die Reaktion gestoppt wird. Somit erhält man Proben mit Insertsequenzen unterschiedlicher Längen. Es folgt die Evaluierung geeigneter Deletionen mittels

Gelelektrophorese und anschließend die Religation und Transformation der Fragmente mit dem intakten Vektor. Durch Klonierung erhält man eine Deletionsbank des Inserts und die Plasmide dieser Deletionsbank können mit dem Vektorprimer der Deletionsseite sequenziert werden. Lücken in der Sequenzierung beider DNA-Stränge, die aus dem Fehlen geeigneter Deletionsklone resultierten, können z.B. durch Sequenzierung des intakten Inserts mit zusätzlichen Primern geschlossen werden.

9.8. DNA-Sequenzierungsmittels *Dye Terminator Cycle Sequencing*

Zur DNA-Sequenzierung wurde die Dideoxymethode nach Sanger et al. (Sanger et al. 1996) unter Verwendung des Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kits (ABI, Applied Biosystems) und mit einem Automatischen Sequenziergerät (Modell 373A, ABI) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template-DNA dientenaufgereinigte Plasmid-DNA (s. 9.1.1.) oder aus einem Agarosegel isolierte PCR-Produkte (s. 9.3. und 9.6.1.). Die Template-DNA wurde vor der Thermocycler-Reaktion für 30 min dialysiert (s. 9.1.6.). Die Thermocycler-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Landgraf TC Varius V) durchgeführt, wobei die Annealing-Temperatur etwa 10°C unter der Schmelztemperatur des verwendeten Primers gewählt wurde.

Premix

4	µl	5xTACSPuffer
1	µl	dNTP Mix
1	µl	DyeDeoxyA Terminator
1	µl	DyeDeoxyT Terminator
1	µl	DyeDeoxyG Terminator
1	µl	DyeDeoxyC Terminator
0,5	µl	Ampli Taq DNA Polymerase

Sequenzier-Ansatz

8	µl	Premix
1	µg	Template
15	pmol	Primer
1	µl	DMSO
ad 20	µl	H ₂ O _M

Ansatz mit ca. 50 µl Mineralöl überschichtet

DMSO wurde bei Ansätzen zugegeben, in denen die Bildung von Sekundärstrukturen vermindert werden sollte.

Thermocycler-Reaktion

1. Segment (1 Zyklus):	15s, 96°C Denaturierung
2. Segment (25-30 Zyklen):	15s, 96°C Denaturierung
	15s, Annealing-Temperatur (ca. 40-60°C)
	60°C, 240s Extension
3. Segment (Hold):	15°C

Der Sequenzierungsansatz wurde nach der Thermocycler-Reaktion aufgereinigt, indem die DNA durch Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,6 und 50 µl Ethanol für 10 min auf Eis gefällt wurde. Nach 30 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde die DNA mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde in 3 µl Formamid/50 mM EDTA, pH 8,0 (5:1) gelöst und bis zur PAGE bei -20°C gelagert. Vor der Auftragung auf das Gel wurde die DNA für 2 min auf 90°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die PAGE wurde auf 5% igen Acrylamidgelen mit einem Automatischen Sequenzierer (Modell 373A, ABI) durchgeführt und gemäß den Angaben des Herstellers ausgewertet.

9.9. Southern Blot Analyse

9.9.1. Digoxigenin-ddUTP (DIG) markierte DNA-Sonden

Für die Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden wurde der PCR DIG Probe Synthesis Kit (Boehringer Mannheim) verwendet.

Die Vorteile in dieser Art der Herstellung liegen zum einen in der hohen Sensitivität der Sonden, da eine hohe Zahl von 100% homologen Gensonden (bei Vernachlässigung der Fehlerrate der Taq-Polymerase) synthetisiert wird, wodurch eine Reaktion unter stringenten Bedingungen ermöglicht wird und zum anderen in dem Verzicht auf Radioaktivität zur Detektion der gesuchten DNA-Fragmente.

Das für die Sondensynthese verwendete Markierungsgemisch enthielt neben den unmarkierten dNTPs auch DIG 11-ddUTP.

PCR-Ansatz

5	µl	10xPCR-Puffer mit MgCl ₂
5	µl	10xPCR DIG-Mix, 1:1 verdünnt mit dNTP-Stammlösung
1	µl	je Primer (20-25 pmol)
0,75	µl	Enzymmix, Expand High Fidelity PCR System
2	µl	Template-DNA
35,25	µl	H ₂ O _M

Der Ansatz wurde gemischt, kurz abzentrifugiert und mit ca. 50 µl Mineralöl (Nujol, Perkin Elmer) überschichtet. Die PCR wurde in einem programmierbaren Thermocycler (Landgraf TC Varius V) wie unter 9.6. beschrieben durchgeführt.

Das PCR-Produkt wurde in einem 0,8% -igen Agarosegel aufgetrennt und daraus isoliert (s. 9.3.) erläuterten Methode aus dem Gel eluiert und schließlich in 30 µl TE aufgenommen. Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

9.9.2. Southern Blotting

Die mit Restriktionsenzym geschnittene, bakterielle genomische DNA wurde in einem großen 0,8% (w/v) Agarosegel bei 80 Volt in einer großen Elektrophorese kammer (Horizon 11-14, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetrennt. Nachdem Gellauf wurde das Gel zunächst geteilt. Der eine Teil wurde in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und dann photographiert, um die korrekte Auftrennung zu kontrollieren, und der zweite Teil wurde wie folgt unter Schwenken weiterbehandelt: 20 min Depurinieren in 0,25 M HCl, zweimal 30 min in Denaturierungslösung

(0,5 M NaOH; 1,5 M HCl) und anschließend zweimal 30 min in Neutralisierungslösung (1 M Tris/HCl pH 7; 3 M NaCl).

Der Transfer auf eine Membran erfolgte über Nacht nach der Methode des Kapillar-Transfers. Hierzu wurden die Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membrane, Pall GmbH, Dreieich) und das 3 mm Filterpapier (Whatman) auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in 20x SSC getränkt. Der Versuchsaufbau erfolgte nach folgendem Schema:

dicke Lage trockenes Papier
 4 Lagen trockenes Filterpapier
 1 Lage in 20x SSC getränktes Filterpapier
 Nylonmembran, in 20x SSC getränkt
 Agarosegel
 3 Lagen in 20x SSC getränktes Filterpapier
 2 Streifen in 20x SSC getränktes Filterpapier, die in ein höher gelegenes
 20x SSC-Reservoir eingetaucht wurden
 eine Pipettenbox o. ä., deren Gewicht den Kapillar-Transfer unterstützte (etwa 150 g)

Die Transfer-Effizienz wurde durch Anfärbung des Agarosegels mit Ethidiumbromid abgeschätzt. Die auf die Membran transferierte DNA wurde durch eine Inkubation für 15 min bei 80°C und anschließender Bestrahlung für 2 min mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm in einem UV-Crosslinker (UV Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA) fixiert. Die Membran konnte entweder bei -20°C gelagert oder für die Sonden-Hybridisierung (s. 9.9.3.) weiter verwendet werden.

9.9.3. Hybridisierung und Detektion

Die Membran wurde in eine Hybridisierungsrolle überführt und mit 20 ml Prähybridisierung / 100 cm² Membranfläche bedeckt. Die Temperatur für die Prähybridisierung und die anschließende Hybridisierung im Hybridisierungssofen lag bei Oligonukleotidsonden 10°C unter dem Schmelzpunkt der markierten Sonden, bei doppelsträngigen DNA-Sonden bei 42°C. Nach 1 h Prähybridisierung wurde die Lösung abgegossen und durch 20 ml frische Hybridisierungslösung mit 10 µl der DIG-markierten DNA-Sonde ersetzt. Doppelsträngige DNA wurde vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur. Für den Nachweis der gebundenen DNA-Sonde wurde der DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (Boehringer) verwendet.

Prähybridisierungslösung (Oligonukleotidsonden):

5xSSC		
0,1	%(w/v)	Natrium-Lauroylsarkosin
0,02	%(w/v)	SDS
1	%(w/v)	Blocking-Reagenz (Boehringer)

Prähybridisierungslösung (dsDNA-Sonden):

wie für Oligonukleotidsonden unter Zugabe von 50% (v/v) Formamid

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung unter Zugabe von

100 pmol markiertes Oligonukleotid/Ansatz bzw.

1 µg markierte doppelsträngige DNA/Ansatz

Die Hybridisierungslösung mit der DIG-markierten Sonde wurde bei -20°C gelagert und konnte mehrfach verwendet werden.

Um unspezifisch gebundene DNA von der Membran zu entfernen, wurde die Membran folgenden Waschgängen unterzogen:

2 x 5 Minuten 2 x SSC mit 0,1 % SDS bei Hybridisierungstemperatur

2 x 5 Minuten 0,1 x SSC mit 0,1 % SDS bei Hybridisierungstemperatur

Die folgenden Volumina beziehen sich auf eine Membranfläche von 100 cm².

Wenn nicht anders angegeben, erfolgt die Inkubation bei RT.

Nach dem letzten, stringenten Waschgang wurde die Membran für 5 min in DIG-Waschpuffer gewaschen und danach für 30 min mit 100 ml DIG-Puffer 2 abgesättigt. Das Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (750 U/ml) wurde 1:5000 in DIG-Puffer 2 verdünnt und die Membran für 30 min in 20 ml dieser Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min in je 20 ml DIG-Waschpuffer gewaschen und für 5 min in 20 ml DIG-Puffer 3 äquilibriert. Das Chemilumineszenz-Substrat CSPD[®] wurde 1:500 in DIG-Puffer 3 verdünnt, die Membran wurde für 10 min in 20 ml CSPD-Lösung inkubiert und danach überschüssige Flüssigkeit verworfen. Die Membran wurde in einem handelsüblichen Plastik- bzw. Gefrierbeutel luftblasenfrei eingeschweißt, für 15 min bei 37°C präinkubiert und in einer Filmkassette bei Raumtemperatur auf einem Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm exponiert. Expositionen wurden mehrfach durchgeführt (30 min bis 24 h), bis die gewünschte Signalstärke erreicht war. Die Filme wurden in einer Entwicklermaschine (Curix 60, Agfa) entwickelt.

Blocking-Reagenz-Stammlösung

10% (w/v) Blocking-Reagenz (Boehringer) in DIG-Puffer 1

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Hybridisierungslösung

5 x SSC

1 % (v/v) Blocking-Reagenz

0,10 % (v/v) N-Lauroylsarkosin

0,02 % (v/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

50 % (v/v) Formamid

DIG-Puffer1

0,10	M	Maleinsäure
0,15	M	NaCl
pH 7,5		

DIG-Waschpuffer

DIG-Puffer1 mit 0,3% Tween 20

DIG-Puffer2

DIG-Puffer1 mit 1% (v/v) Blockingreagenz

DIG-Puffer3

100	mM	Tris-Base
100	mM	NaCl
50	mM	MgCl ₂
pH 9,5		

10. Arbeiten mit RNA

Zur Inaktivierung von RNasen wurden alle Glaswaren und Lösungen durch Inkubation mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) inaktiviert. Am nächsten Tag wurde DEPC mittels Autoklavieren inaktiviert. Steril gelieferte Plastikwaren wurden grundlegend als RNase-frei betrachtet.

10.1. Isolierung und Aufreinigung von RNA**10.1.1. Isolierung von RNA**

Bakterien wurden i.d.R. unter induzierenden Bedingungen angezogen und geerntet. Gesamt-RNA wurde mit dem S.N.A.P. Kit (Invitrogen) oder für größere Mengen mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

10.1.2. DNase-Verdau von RNA

Um mit der RNA isolierte chromosomale DNA zu entfernen, wurden beim S.N.A.P. Kit die mitgelieferte RNase-freie DNase und Puffer nach den Angaben des Herstellers verwendet. Nach Isolierung der RNA mit dem RNeasy Midi Kit wurde die DNA mit RNase-freier DNase I (Boehringer) durch Inkubation für 30 min bei 37°C im DNase-Ansatz entfernt. Die RNA wurde anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt (s. 10.1.3.).

DNase-Ansatz

10	μl	5xPuffer
5	μl	0,1MDTT
0,25	μl	RNAasin
0,5	μl	10U/μlDNaseI
100-200	μg	RNA
ad50	μl	H ₂ O _M

5xPuffer

250	mM	Tris-HCl, pH 8,3
375	mM	KCl
15	mM	MgCl ₂

10.1.3. Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation

Die Aufreinigung und Fällung der RNA erfolgte wie unter 9.1.3. und 9.1.4. für DNA beschrieben.

10.2. Analyse von RNA-Präparationen**10.2.1. Konzentrationsbestimmung der RNA**

Entsprechend der Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen (s. 9.2.3.) wurde die Konzentration und Reinheit einer RNA-Lösung durch photometrische Messung der OD_{260nm} bzw. OD_{280nm} bestimmt. OD_{260nm} = 1 entspricht 40 μg RNA/ml (Sambrook et al. 1989; Davis et al. 1980). Für reine RNA-Lösungen gelten die gleichen Quotienten-Angaben wie für DNA-Lösungen.

10.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der RNA zur schnellen quantitativen und qualitativen Analyse wurde wie unter 9.2.1. für DNA beschrieben eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Denaturierende Agarosegele für Northern Blot Analysen wurden in RNase-freien Bedingungen gegossen, indem die Gelkammer mit RNase Erase (ICN Biomedicals) ausgewischt und anschließend mit DEPC behandeltem H₂O_M gespült wurde. Für denaturierende Agarosegele wurden nach Lösung der Agarose (s. 9.2.1.) in DEPC behandeltem TAE und Abkühlung auf etwa 55°C 1,76 ml 37% (v/v) Formaldehyd hinzugefügt.

10xLaufpuffer

20,9	g	MOPS
1,9	g	EDTA
8,3	ml	3M Na-Acetat, pH 6,0
ad500	ml	DEPC behandeltes H ₂ O _M

Die Lösung wurde mit 8-10 ml 5N NaOH auf pH 6,7-7,0 eingestellt und unter Aluminiumfolie dunkel bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Agarosegellösung

1,3	g	Agarose
10	ml	10xLaufpuffer
88	ml	DEPCbehandeltes H_2O_M

Vor Auftragung der RNA-Proben wurde die RNA gefällt (s. 10.1.3.), in 7,5 μ l DEPC behandeltem H_2O_M resuspendiert und mit 15 μ l Formamid/Formaldehyd/10xLaufpuffer (2:1:1) und 2,5 μ l Bromphenol-Lösung versetzt. Die RNA-Proben wurden für 5 min bei 65°C inkubiert und kurz auf Eis abgekühlt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 70 V. Die RNA wurde durch Färbung des Gels im Ethidiumbromidbad und anschließender Detektion in UV-Licht analysiert oder für die Northern Blot Analyse auf eine Membran transferiert.

Für die Größenbestimmung der RNA wurde eine RNA-Leiter (Gibco) als Standard mit auf das Gelaufgetragen.

Bromphenol-Lösung

10xLaufpuffer	mit
0,4% (w/v)	Bromphenolblau
50 % (v/v)	Glycerin

10.3. Northern Blot Analyse**10.3.1. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit [α -³²P] dCTP oder [γ -³²P] dATP**

Zur radioaktiven Markierung von DNA mit [α -³²P] dCTP (Northern Blot/ Southern Blot/South Western Blot Analyse) oder [γ -³²P] dATP (Primer Extension Analyse) wurde der Prime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) unter den Angaben des Herstellers verwendet und die markierte DNA-Sonde über Nick-Sephadex G-50-Säulen (Pharmacia Biotech) ebenfalls nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die eingebaute Radioaktivität wurde durch die Messung von jeweils 1 μ l markierter DNA in einem Szintillationszähler (Beckman LS1801, Beckman) bestimmt.

10.3.2. Northern Blotting

Der Transfer von RNA auf eine Byodine B Transfer Membran (Pall) erfolgte mittels des alkalisch downward-Northern-Blot (Scheinert, 1996). Nach denaturierender Gelelektrophorese (s. 10.2.2.) wurden die Nylonmembran und Blotting Papier (Whatman 3 MM) in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des downward-Kapillar-Transfers erfolgte wie folgend beschrieben:

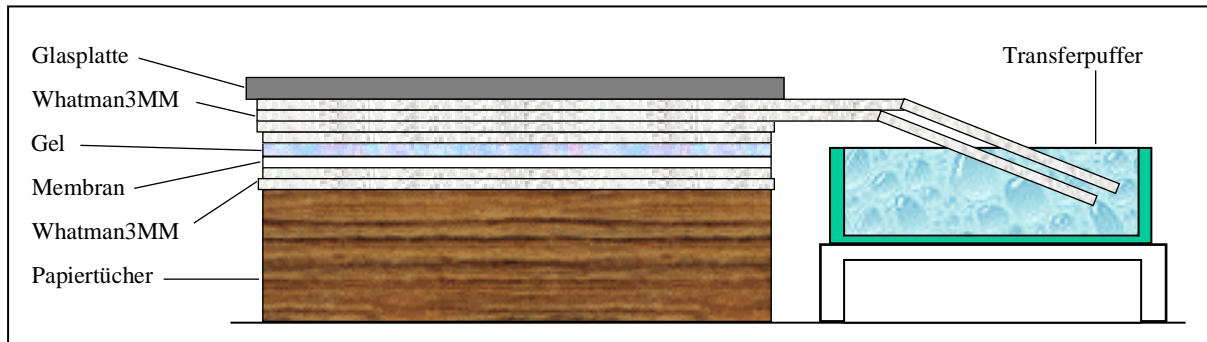


Abb.5: Aufbau des downward-Kapillar-Transfers (aus: Ausubel, 1995)

In eine Plastikschiene wurden etwa 5 cm gewöhnliches Papier aus dem Papierspender gestapelt. Hierauf wurden 4 Lagen trockenes Blotting-Papier, jeweils mit Transferpuffer äquilibriert, eine Lage Blotting-Papier und Nylonmembran, das Agarosegel, 3 Lagen mit Transferpuffer äquilibriertes Blotting-Papier und 2 lange mit Transferpuffer äquilibrierte Blotting-Papierstreifen, die eine Verbindung zwischen dem Transferstapel und dem Pufferreservoir herstellten. Das Pufferreservoir wurde auf eine erhöhte Position gestellt. Eine Gelelektrophorese-Glasplatte diente zur Beschwerung des Transferstapels.

Transferpuffer

3	M	NaCl
8	mM	NaOH
2	mM	Na-Lauroylsarkosin

Neutralisationspuffer

200	mM	Na-Phosphat, pH 6,8
-----	----	---------------------

Der Transfer wurde für 2 h durchgeführt. Die Membran wurde anschließend für 10 min in Neutralisationspuffer gelegt und dann für 15 min bei 80°C getrocknet. Es wurde ein *crosslinking* der RNA für 2 min (UV Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt und die Hybridisierung erfolgte sofort im Anschluß wie unter 10.3.3. beschrieben.

10.3.3. Hybridisierung und Detektion

Die Membran wurde in eine Hybridisierungsrolle überführt und mit 20 ml Prähybridisierung / 100 cm² Membranfläche bedeckt. Nach 1 h Prähybridisierung in Prähybridisierungslösung bei 42°C wurde die Lösung abgegossen und durch 10 ml frische Hybridisierungslösung mit [α -³²P] dCTP-markierter DNA-Sonde ersetzt. Die dsDNA-Sonden wurden dabei vor Zugabe zur Hybridisierungslösung für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Für den Nachweis der gebundenen DNA-Sonde wurde der Blot zweimal bei Raumtemperatur in Waschpuffer A und zweimal bei 42°C in Waschpuffer B für jeweils 15 min gewaschen und anschließend in eine Folie gewickelt und in eine Phosphor Screen-Cassette (Molecular Dynamics, Chesham, Bucks, England) gelegt. Die Exposition erfolgte über Nacht bei -70°C, um die Diffusionsstrahlung zu mindern. Am nächsten Tag wurden mit dem PC

gesteuerten Densitometer Storm 860 (Molecular Dynamics) die erhaltenen Radioaktivsignale digitalisiert und mit Bildbearbeitungsprogrammen weiterbearbeitet.

50x Denhardt's Lösung

1	% (v/v)	Ficoll 400
1	% (v/v)	Polyvinylpyrrolidon
1	% (w/v)	BSA

Die Lösung wurde steril filtriert und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Prähybridisierungslösung

5	g	Dextransulfat
12	ml	20x SSC
0,25	ml	2M Tris, pH 7,5
1	ml	50x Denhardt's Lösung
2,5	ml	20% (w/v) SDS
25	ml	Formamid

Dextransulfat wurde in 20x SSC bei 80°C gelöst, danach wurden die anderen Komponenten zugegeben und mit H_2O auf 50 ml gebracht. Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung mit Zugabe von radioaktiv markierter DNA-Sonde.

Waschpuffer A

2x SSC
0,1% (w/v) SDS

Waschpuffer B

0,1x SSC
0,1% (w/v) SDS

10.4. Bestimmung des Transkriptionsstarts

10.4.1. 5'-RACE

Die Amplifikation von 5'-Enden einer cDNA wurde mit dem 5'/3' Race Kit (Boehringer) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde wie unter 10.1.1. beschrieben Gesamt-RNA isoliert und aufgereinigt. Die in der RNA-Präparation enthaltene mRNA diente als Template für eine Reverse Transkription, wobei als Primer sequenzspezifische Oligonukleotide unter Berücksichtigung der Herstellerangaben verwendet wurden. Nach Degradation der RNA wurde an das 3'-Ende der amplifizierten cDNA, und somit bei Vorlage einer intakten mRNA an den komplementären Startpunkt der mRNA-Transkription, mittels Terminaler Transferase ein poly-A-Schwanz angehängt. In einer *nested* PCR, in der ein zweiter sequenzspezifischer Primer

upstream vom ersten Primer eingesetzt wurde, wurde ein PCR-Produkt erzeugt, dessen Sequenz von der Position des zweiten Primers bis zum potentiellen Transkriptionsstartpunkt der mRNA reichte. Das PCR-Produkt wurde isoliert (s. 9.3.), direkt sequenziert (s. 9.8.) oder zuvor kloniert (s. 9.6.4.).

10.4.2. Primer Extension Analyse

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Bakterien in M9-Glucose Medium mit 10 mM bzw. 430 mM NaCl bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Die RNA-Isolierung erfolgte wie unter 10.1.1. beschrieben. Die Markierung der Oligonukleotidsonde mit [γ -³²P]dATP wie unter 10.3.1. beschrieben vollzogen. Nach Inkubation der markierten Sonde mit 25 µg Gesamt-RNA für 20 min bei 50°C wurde eine reverse Transkription mit Hilfe von 1 U AMV Reverse Transkriptase (Promega, USA) für 40 min bei 42°C durchgeführt. Die Produkte der reversen Transkription wurden durch den Vergleich mit einer parallel erstellten Sequenz-Leiter analysiert. Die radioaktive Sequenzierung zur Erstellung einer Sequenz-Leiter wurde mit dem gleichen Oligonukleotid unter der Verwendung des Deaza G/A ^{T7} Sequencing Mixes Kit (Pharmacia Biotech, USA) nach den Angaben des Herstellers ausgeführt.

11. Datenverarbeitung

Aufgrund der unverzichtbaren Stellung der computergestützten Datenverarbeitung innerhalb der Wissenschaft seien dieser Stelle auf einige der zahlreichen und sehr nützlichen Programme zur Sequenzanalyse hingewiesen. Viele Analysen wurden mit Hilfe im Internet frei zugänglicher Hilfsprogramme durchgeführt. Es sei jedoch darauf verwiesen, daß das Internet ein sehr schnell alternierendes Medium ist und somit keine Gewähr auf annotierte

links

Tab.13: Nützliche *link.sim* World Wide Web (WWW).

L	AdvancedPubMedSearch	http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/medline.html
L	HighWirePress	http://intl.highwire.org/
L	WelcomeToTheASM	http://www.asmta.org/asm.htm
L	InfectionandImmunity	http://iai.asm.org/
L	JournalofBacteriology	http://intl-jb.asm.org/
L	MolecularMicrobiology	http://www.blackwell-science.com/
L	BlackwellJournalsbyTitle	http://www.blackwell-science.com/products/journals/jnltitle.htm
L	MicrobiologyandMolecular BiologyReviews	http://mmbr.asm.org/
D	SRSWWWatEMBL-EBI	http://srs.ebi.ac.uk:5000/
D	SRSWWWatGBF,Braunschweig	http://transfac.gbf-braunschweig.de/srs5/
M	BCMSearchLauncher	http://kiwi.imgen.bcm.tmc.edu:8088/search-launcher/launcher.html
GM	TheNationalCenterfor BiotechnologyInformation	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
M	EBIServices	http://www2.ebi.ac.uk/services.html
P	ExpASY-Tools	http://expasy.hcuge.ch/www/tools.html
PT	TopPred2	http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/toppredServer.cgi
	BIMASHomePage	http://bimas.dcrn.nih.gov/
M	Geneprediction	http://www-hgc.lbl.gov/projects/genie.html
PR	NNPredict	http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html
PR	Promoterpredictioninputform	http://www-hgc.lbl.gov/projects/promoter.html
P	PSORTWWWServer	http://psort.nibb.ac.jp/
P	WebSignalScanService	http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/signal/
P	DASTransmembranePrediction	http://www.biokemi.su.se/~server/DAS/
PM	Proteinmotiffingerprints	http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/PRINTS/PRINTS.html
PM	ProDomBLASTwithgraphical output	http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/blast_form.html
PM	BlockSearch	http://www.blocks.fhcrc.org/blocks_search.html
D	AmericanTypeCultureCollection	http://www.atcc.org/
G	BioMedNet	http://biomednet.com/
BP	MolecularBiologyProtocolson theWWW	http://www.horizonpress.com/gateway/protocols.html
BP	ProtocolsontheWorldWideWeb	http://www.ifrn.bbsrc.ac.uk/gm/lab/docs/protocols.html
BP	MicrobiologicalResources	http://www.ccc.nottingham.ac.uk/~mbzsrs/MIC.HTML
G	BiologyWebServers	http://www-hgc.lbl.gov/BioServer.html
D	VectorDB	http://www.atcg.com/vectordb/
EC	<i>Escherichiacoli</i> Databank	http://genome4.aist-nara.ac.jp/
EC	E.coliIndex	http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols.html
EC	ECDChomepage	http://susi.bio.uni-giessen.de/usr/local/www/html/ecdc.html
EC	E.coliInformation	http://ifse.tamu.edu/ifse/ecoli/ecoli.htm
EC	E.coliInformationPage	http://www.ai.sri.com/ecocyc/ecoli.html
EC	pathogenicE.coli	http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols.html
I	EUROGENTEC	http://imgt.cnusc.fr:8104/textes/EURO.html
G	WorldHealthOrganizationWWW HomePage	http://www.who.ch/
G	RobertKoch-Institut	http://www.rki.de/
G	Gentechnik-Antragsformulare	http://www.bayern.de/Umwelt/Gentechnik/Formulare/

BP, Protokolle für biologisches Arbeiten; D, Datenbank; EC, *E. coli* Informationen; G, generelle Informationen; I, Immunisierung; L, Literatur; M, Molekularbiologie; P, Proteine; PM, Protein-Motive; PR, Promotor- Vorhersage; PT, Topologie- Vorhersage

III. ERGEBNISSE

EHEC zeigen in der Infektion an Zellkulturen phänotypische Ausprägungen, die den Infektionen mit EPEC ähneln. Die gemeinsame genetische Grundlage dieser *attaching and effacing* verursachenden Bakterien ist die Pathogenitätsinsel LEE, deren Transfer in einen nicht-pathogenen *E. coli* -Stamm in der Infektion eukaryontischer Zellen zu einem gleichen A/E-Effekt führt wie bei EHEC und EPEC (McDaniel und Kaper, 1997). Somit sind alle für die Infektion relevanten Faktoren auf diesem chromosomalen Abschnitt kodiert. Das Megaplasmid aus EPEC enthält darüber hinaus das Gen für einen positiven Regulator für Virulenzplasmide des Megaplasmid und des LEE. EHEC enthalten jedoch ein anderes Megaplasmid als EPEC, EHEC führen keinen nachweisbaren Tyrosin-Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors durch, EHEC gelten im Gegensatz zu EPEC als nicht-invasiv und EHEC besiedeln *in vivo* einen anderen Bereich des Darms als EPEC. Trotz der homologen Pathogenitätsinsel gibt es also zahlreiche Unterschiede zwischen einer Infektion mit EPEC bzw. EHEC.

Es sollten in dieser Arbeit neue Virulenzfaktoren aus EHEC identifiziert, charakterisiert und in der Regulation ihrer Expression untersucht werden. Als Ausgangsstamm wurde EHEC EDL933 (Serotyp O157:H7) gewählt, der als Referenzstamm für EHEC gilt. Daneben wurden zu Vergleichszwecken andere EHEC- und STEC-Stämme verwendet, wobei auf Grund der hohen Sekretionseffizienz der STEC-Stamm 413.89-1 eine besondere Stellung einnahm.

1. Optimierung der Infektionsbedingungen

Die zu Beginn der Arbeit verfügbaren Beschreibungen für Versuchsbedingungen zur Infektion von Epithelzellen mit EPEC erwiesen sich nur wenig geeignet für Infektionen mit EHEC, bei denen neben qualitativen auch quantitative Analysen durchgeführt werden sollten. Daher wurden die Bedingungen derart optimiert, dass eine möglichst große Anzahl adhärenter Bakterien nach möglichst kurzer Infektionszeit erzielt wurde. Dadurch wurde auch die Belastung der eukaryontischen Zellen durch physikalische (pH-Wert) und bakterielle (toxische Abbauprodukte, Cytotoxine) Faktoren vermindert.

1.1. Wahl der Zelllinie und 'Aktivierung' von EHEC

Die Adhärenz und Invasivität von EHEC EDL933 wurden im Verlaufe dieser Arbeit durch die Veränderung der Anzuchtbedingungen deutlich gesteigert. Aber auch der Wechsel der eukaryontischen Wirtszellen von HEp-2 und HeLa auf eine HeLa-Zelllinie, die von Garcia-del Portillo zur Verfügung gestellt worden war, resultierte in einer deutlich besseren Infektionseffizienz. Tatsächlich wurden von McKee und O'Brien (McKee und O'Brien, 1995) bedeutende Unterschiede bezüglich der Adhärenz und Invasivität verschiedener pathogener *E. coli*, so auch EHEC EDL933, bei verschiedenen Zelllinien verzeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Infektionsbedingungen für EHEC EDL933 an HeLa-Zellen so verbessert werden, dass eine Steigerung der Infektionseffizienz von ursprünglich durchschnittlich 20 EHEC EDL933/HeLa-Zelle innerhalb von 6 h Infektionsdauer auf bis zu 90 EHEC EDL933/HeLa-Zelle innerhalb von 4 h erzielt wurde (s. Abb. 6, A und B). Die Anzahl und Intensität der einzelnen Waschschritte während der Infektion, die für die Stabilisierung der HeLa-Zellen notwendig sind,

E.

tragen jedoch entscheidend zur Anzahl adhärenter Bakterien bei. Ebenso scheint eine geringere Anzahl an Bakterien während der gesamten Infektionsdauer die Qualität der Aktinakkumulation und damit der Pedestal-Bildung zu verbessern (s. Abb. 6, C und D).

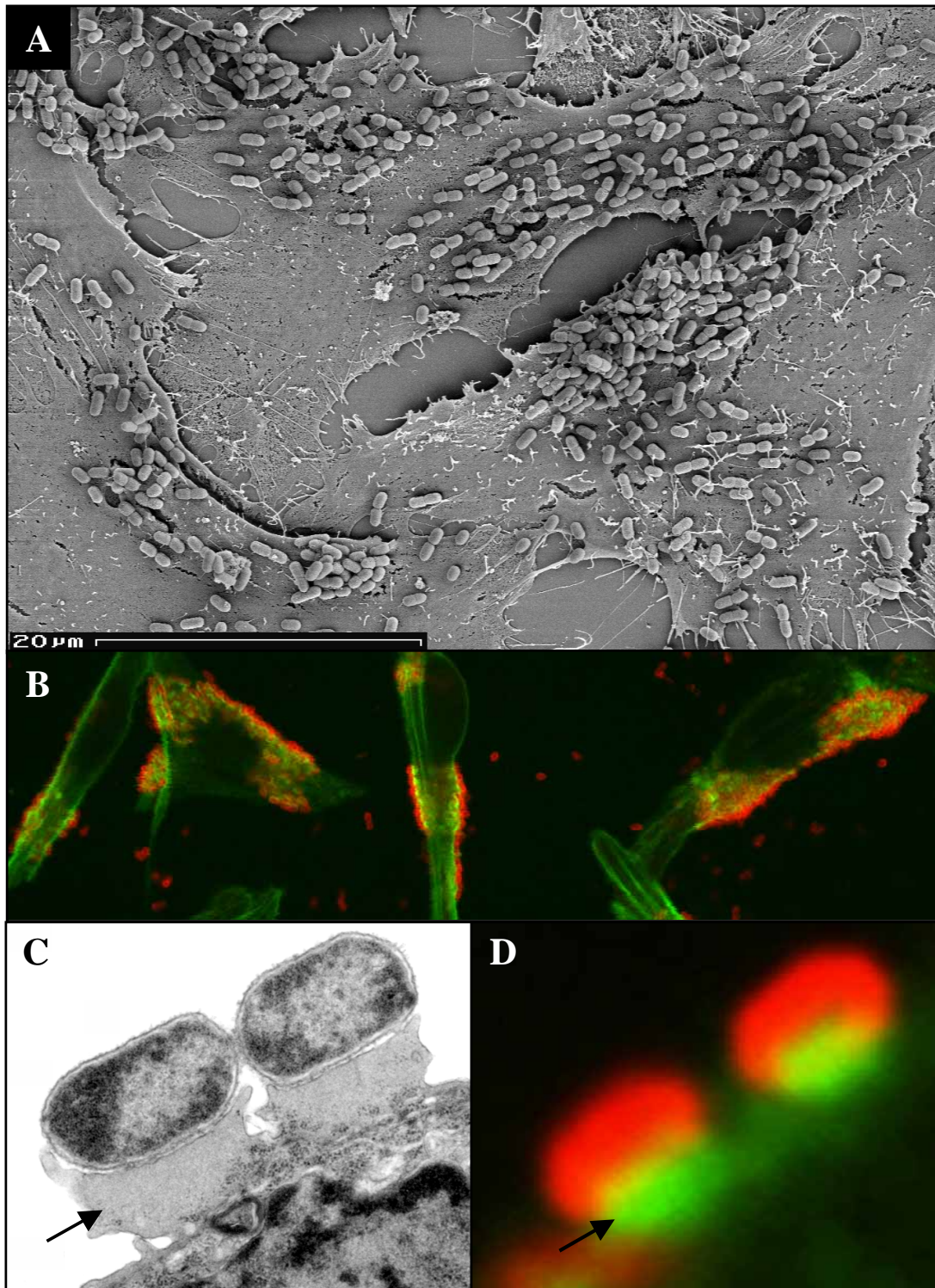


Abb. 6: Infektion von EHEC EDL933 auf HeLa-Zellen und Pedestal-Bildung. (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme EHEC EDL933 infizierter HeLa-Zellen nach 4h Infektion. (B) Parallel wurde in einer immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse EHEC EDL933 mittels AS-anti-O157 und TRITC, Aktin mit FITC gekoppeltem Phalloidin markiert. (C) EHEC EDL933 zeigte unter den Bedingungen eines geringen MOI und häufigen Waschens eine verstärkte Bildung von Pedestals (der Pfeil demonstriert Aktin enthaltende Pedestals). Demnach erfolgte die Rekrutierung von Aktin unterhalb

adhärenter Bakterien umso erfolgreicher, je weniger Bakterien auf der Oberfläche der Wirtszellen vorhanden waren. (D) EHEC EDL933 wurde mittels AS-anti-O157 und TRITC, Aktin mit FITC gekoppeltem Phalloidin markiert (der Pfeil demonstriert Aktin enthaltende Pedestals).

Es war gezeigt worden, dass EHEC in Zellkulturmedium bei 37°C vermehrt Proteine sekretiert, die für die Infektion mit eukaryontischen Wirtszellen notwendig sind. Daher wurden für die 'Aktivierung' von EHEC EDL933 für eine Infektion zunächst die Bakterien über Nacht in LB bei 37°C angezogen. Die Induktion der Sekretion von Proteinen erfolgte dann durch die Überführung der Bakterien in Zellkulturmedium mit 25-100 mM HEPES, wobei das Inokulum 1:20 verdünnt wurde. Nach 3 h Wachstum bei 37°C in 5% CO₂ ohne Schütteln wurde ein Aliquot dieser Suspension für die Infektion eingesetzt. Das notwendige Vermeiden von Scherkräften während der 'Aktivierungsphase' erklärt sich aus dem Erhalt von Oberflächenstrukturen, wie in 4.7. näher erläutert wird.

1.2. Invasivität von EHEC EDL933 und Einfluss von FCS auf die Invasion

Das Invasionsverhalten von EHEC EDL933 ist umstritten. Oelschlaeger et al. (Oelschlaeger et al. 1994) zeigten 1994 das invasive Verhalten von EHEC EDL933 in T24 und HCT-8-Zellen auf, während McKee und O'Brien (McKee und O'Brien, 1995) dem widersetzten, dass EHEC EDL933 nicht invasiver sei als nicht-pathogene *E. coli* der normalen Darmflora. Allerdings verwendeten McKee und O'Brien Bakterien in der stationären Phase als Inokulum, was sich deutlich von den 'aktivierten' Bakterien (s. 1.1.) unterscheidet. In dieser Arbeit wurde die Invasivität von EHEC EDL933 nach 3 h Infektion von HeLa-Zellen mit 'aktivierten' Bakterien auf etwa 0,2% intrazelluläre Bakterien/CFU des Inokulums ermittelt. Diese Größenordnung entspricht ungefähr der durch McKee et al. bestimmten Invasionsrate und darf als schwach invasiv eingestuft werden. Neben den quantitativen Untersuchungen belegten auch elektronenmikroskopische Analysen, dass EHEC EDL933 durchaus in der Lage war, HeLa-Zellen zu invadieren (s. Abb. 7).

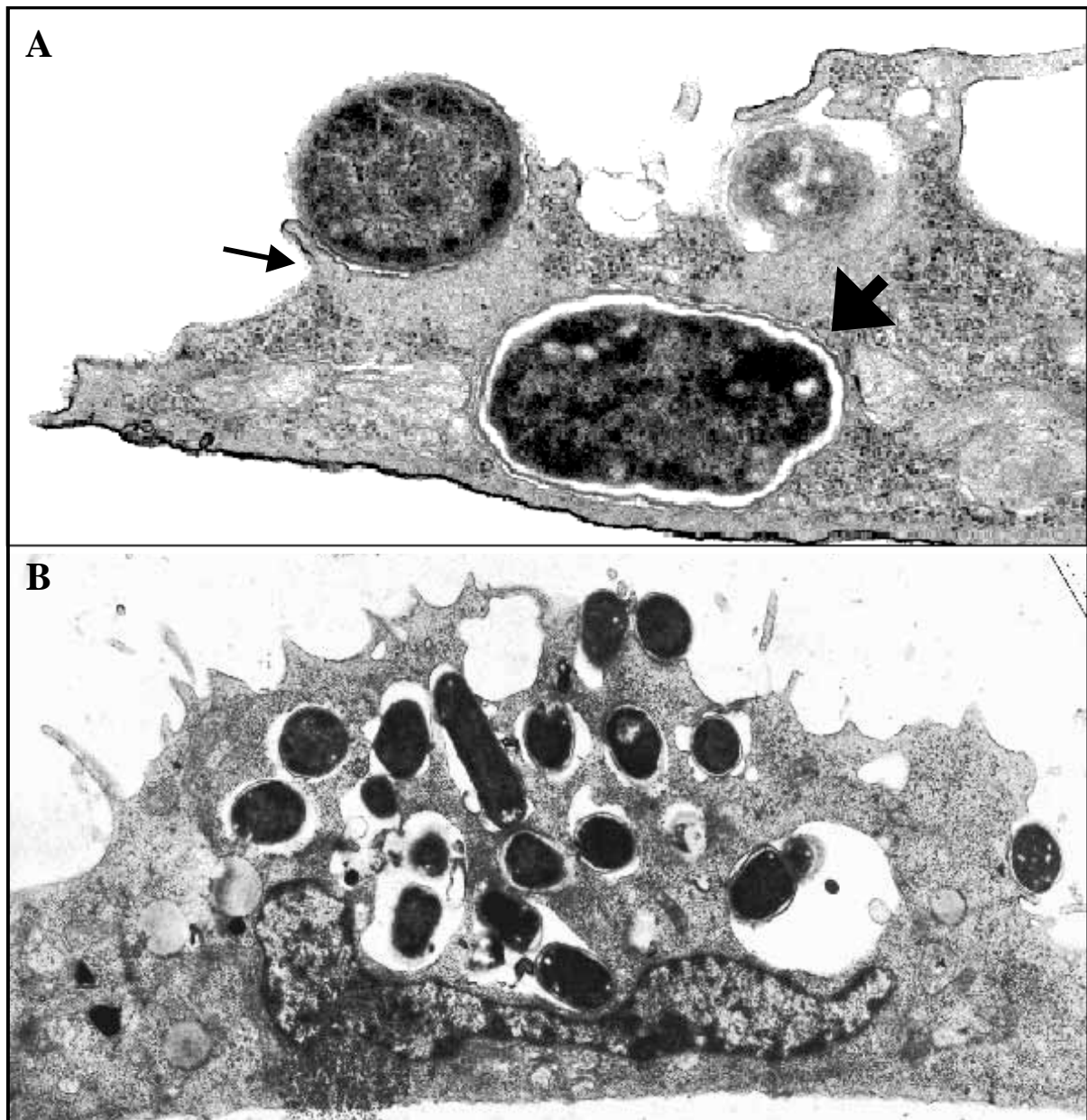


Abb. 7: Invasion von EHEC EDL933 in HeLa-Zellen. (A) Intrazelluläre Bakterien waren durch Ultradiünnschnitte und transmissionselektronenmikroskopische Analyse detektierbar. Der dünne Pfeil verweist auf ein Pedestaleines adhärenenten Bakteriums, der dicke Pfeil indiziert ein intrazelluläres Bakterium in einem vakuolaren Kompartiment. (B) Die HeLa-Zellen waren bisweilen massiv invadiert und intrazelluläre Bakterien schienensich auch freim Zellulären Cytosol zu befinden.

Es konnten zwei Typen der Invasion festgestellt werden. Der häufiger beobachtete Mechanismus zeigte Ähnlichkeiten zum *membraneruffling* (s. Abb. 8, D), wie dies für *Salmonella* bekannt ist (Takeuchi, 1967). Mit diesem Ereignis ging die Stimulierung von Mikrovilli einher, welche die Bakterienz. T. so stark umschlungen, dass diese in der Rasterelektronenmikroskopischen Analyse kaum noch zu erkennen waren (s. Abb. 8, A-C). Der zweite Invasionsmechanismus ähnelte

weder dem *membraneruffling* noch dem *zipper* Mechanismus. Vielmehr schien die Bakterien direkt durch eine Pore in die eukaryontischen Zelle einzudringen (s. Abb. 8, E).

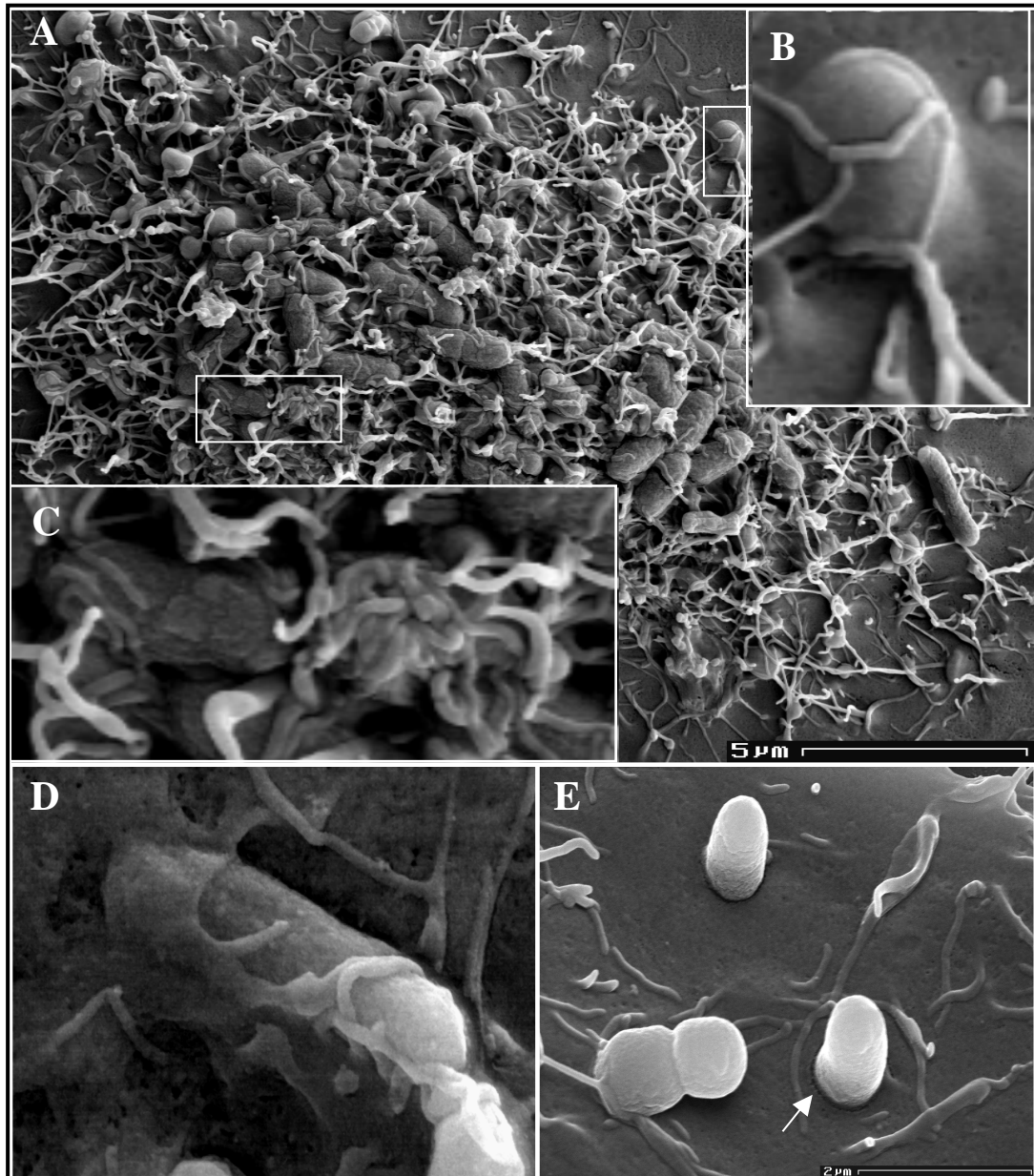


Abb. 8: Mechanismen der Invasion von EHEC EDL933. Die Infektion von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 führte zur starken Bildung von Mikrovilli (A), die an die Bakterien anhafteten (B und C). Invadierende Bakterien zeigten *membraneruffling* ähnliche Muster (D) oder direkte Invasionsmechanismen ohne eine erkennbare Vermittlung durch die Zellmembran (Pfeil in E).

Für andere pathogene Bakterien wurde beschrieben, dass die beobachtete Invasion abhängig von dem zellulären Zusatz von FCS in das Zellkulturmedium war (Lindl und Bauer, 1994). Hierbei muß natürlich betont werden, dass FCS ein biologisches Material, das sich in seiner Zusammensetzung von Charge zu Charge erheblich variieren kann (Lindl und Bauer, 1994). Um etwaige Auswirkungen von FCS in der Invasion von EHEC EDL933 in HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden Infektionen mit und ohne Zusatz von FCS zum Zellkulturmedium durchgeführt (s. Abb. 9). Der Vergleich ergab, dass die Invasion von EHEC EDL933 in die

HeLa-Zellen nicht durch FCS gefördert wurde. Im Gegenteil bewirkte der Zusatz von FCS in das Zellkulturmedium eine etwa 60%ige Verminderung der Invasionsrate (s. Abb. 9). Hitzeinaktiviertes FCS hingegen reduzierte die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) nach Gentamicin-Behandlung um etwa 40% im Vergleich zum Wildtyp. Es ist zu vermuten, dass FCS aktives Komplement und spezifische Antikörper gegen STEC-Epitope enthält, da in etwa 80% des Viehbestandes STEC nachgewiesen werden konnten (s. Einleitung). Die Konservierung der Pathogenitätsinsel LEE und in den meisten Fällen des Megaplasmid legen die Vermutung nahe, dass bereits der Kälberfötus mit spezifischen Faktoren des Immunsystems gegen STEC geschützt ist und diese Faktoren innerhalb der STEC/EHEC-Gruppe kreuzreaktiv sind. Dass STEC 413.89-1-spezifische monoklonale Antikörper neben Proteinen aus anderen STEC auch mit den homologen Proteinen aus EPEC E2348/69 kreuzreagieren können, wurde im Rahmen dieser Arbeit beobachtet (Ebel et al., 1996; diese Arbeit, nicht gezeigt). Der Effekt durch hitzeinaktiviertes FCS, indem das Komplement inaktiv vorliegt, lässt sich möglicherweise durch vorhandene Antikörper erklären, die eine Adhäsion vermindern.

Der Zusatz von FCS in das Infektionsmedium wirkte sich nachteilig auf die Invasivität und sicherauch auf die Adhärenz von EHEC EDL933 aus, und daher wurde auf die Zugabe von FCS verzichtet.

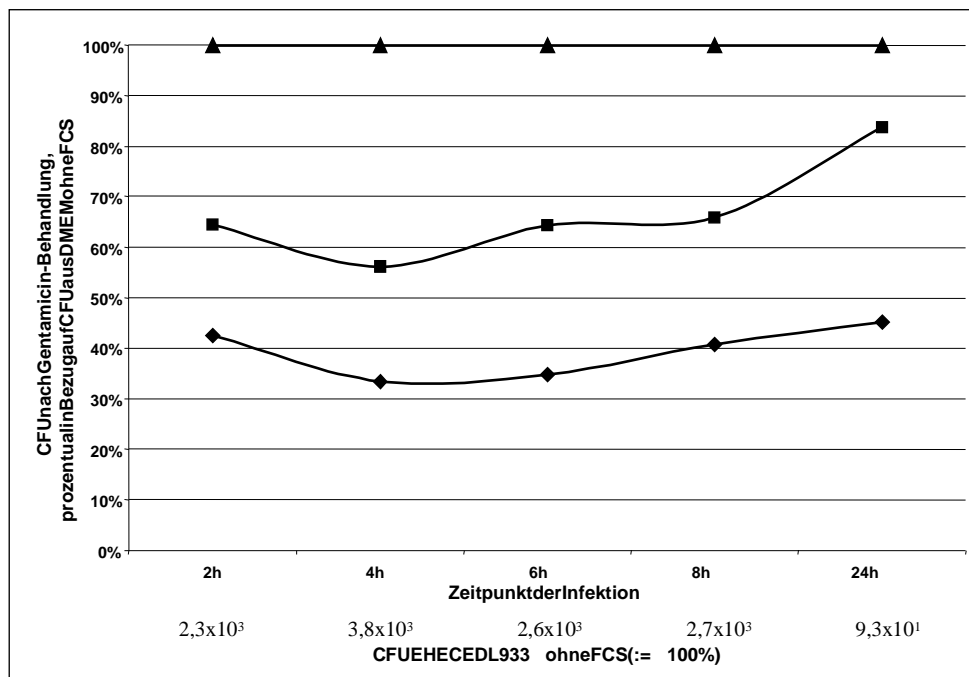


Abb. 9: Einfluss von FCS auf die Invasion von EHEC EDL933. Die Infektionen von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 wurden ohne den Zusatz von FCS (▲), mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (■) und mit 10% (v/v) FCS (◆) durchgeführt. Die Anzahl intrazellulärer Bakterien wurde mittels des Gentamicin Assays bestimmt und prozentual zur CFU intrazellulärer Bakterien des Versuches ohne FCS dargestellt.

2. Charakterisierung von EspB

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung neuer Virulenzfaktoren aus EHEC. Zu Beginn dieser Arbeit waren für die Nukleotidsequenz zwischen

dem Intimin kodierenden *eaeA* und dem für das sekretierte Protein EspB kodierenden Gen *espB* in den Datenbanken lediglich die Nukleotidsequenzen von *eaeA* aus EPEC E2349/69 und EHEC EDL933 sowie die Sequenz von *espB* aus EPEC E2348/69 (*espB*_{EPEC E2348/69}) erhältlich. Das *eaeA* Gen kodiert für das 94 kDa bzw. 97 kDa große Intimin, ein Protein der äußeren Membran, das für die enge Anhaftung der Bakterien an die Wirtszellen verantwortlich ist (Yu und Kaper, 1992; Jerse et al. 1990; Beebakhee et al. 1992); s. Einleitung). In EPEC liegt etwa 4,4 kb downstream von *eaeA* das Gen *espB* (*eaeB*), das von den Bakterien in das Medium sekretiert wird und für den A/E-Phänotyp sowie für die Signaltransduktion in den eukaryontischen Zellen (mit) verantwortlich ist (Foubister et al. 1994; Donnenberg et al. 1993b). EspB wird über das Typ III Sekretionssystem ins Medium ausgeschleust (Jarvis et al. 1995), das u. a. von den ebenfalls chromosomal kodierten Proteinen EscV, EscN, EscC und EscJ (SepA-D) etabliert wird. Diese Proteine zeigen Homologien zu Komponenten aus den Typ III Sekretionssystemen von *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* und pflanzenpathogenen Gram-negativen Bakterien (van Gijsegem et al. 1993; Salmond und Reeves, 1993; Russel, 1994; Jarvis et al. 1995), deren kodierende Bereiche auf Pathogenitätsinseln oder Virulenzplasmiden lokalisiert sind. McDaniel et al. (McDaniel et al. 1995) wiesen nach, dass alle intestinalen Pathogene, die A/E-Effekte verursachen, eine große chromosomale Pathogenitätsinsel LEE (*locus of enterocyte effacement*) enthalten, auf der die Faktoren des Typ III Sekretionssystems sowie Intimin und EspB kodiert vorliegen. Zwischen *eaeA* und *espB* liegende Gene waren ad dato unbekannt, aber es war auf Grund der Lage innerhalb eines offensichtlich weit verbreiteten konservierten LEE zu erwarten, dass Operatoren in diesem Abschnitt eine bedeutende Aufgabe in der Pathogenität der Organismen einnehmen. Daher sollte zunächst das Gen *espB* aus EHEC EDL933 kloniert, sequenziert und dessen Homologien zu bekannten Sequenzen geklärt werden, um eine Basis für die Klonierung der unbekannten Sequenz zwischen *eaeA* und *espB* zu erhalten.

2.1. Klonierung und Sequenzierung von *espB* aus STEC

Die N-terminale Aminosäuresequenz des Proteins EspB aus STEC 413.89-1 war von Ebel et al. bei der Analyse sekretierter Proteine von STEC determiniert worden. Der hiervon abgeleitete und in Anlehnung an die Nukleotidsequenz *espB* aus EPEC E2348/69 konstruierte Primer ANK6556 für den 5'-Bereich des Gens sowie der von der *espB*_{EPEC E2348/69}-Sequenz hergeleitete Primer ANK6377 für den 3'-Bereich des Gens ermöglichten in einer Kolonie-PCR (k-PCR) mit EHEC EDL933 die Amplifikation von *espB* (*espB*_{EDL933}). Gleichmaßen wurde *espB* aus STEC 413.89-1 (*espB*_{STEC 413.89-1}) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in pCR II kloniert und mit Vektor-Primern sequenziert. Die Nukleotidsequenzen wurden im Lauf der Arbeit durch weitere PCR-Amplifikationen und Sequenzierungen bestätigt. *espB*_{EDL933} und *espB*_{STEC 413.89-1} kodierten für ORFs von 312 bzw. 314 Aminosäuren. Für die Proteine EspB_{EDL933} und EspB_{STEC 413.89-1} wurden theoretische Molekulargewichte von 32645 bzw. 33206 Da und pI-Werte von 5,33 bzw. 5,41 ermittelt. Die Topologie- und Transmembranvorhersagen mittels PSORT (Nakai und Kanehisa, 1991) und TopPred (Claros und von Heijne, 1994) ergaben, dass es sich bei EspB der STEC-Stämme mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,225$ um putative integrale Membranproteine mit ein bis drei membrandurchspannenden Segmenten handelte. Die Topologievorhersage in Bezug auf eine mögliche Lokalisation in der eukaryontischen Membran hingegen ergab eine Wahrscheinlichkeit von $P = 0,65$. Coiled-coil Vorhersagen nach dem

Algorithmus von Lupas et al. (Lupas et al. 1991) mit einem Sequenzfenster von 28 aa ergaben für EspB_{EDL933} zwei Strukturen bei Q₆₇ – L₁₀₀ (Ausschlussgrenze 0,5) und E₁₄₅ – A₁₇₂ (Ausschlussgrenze 0,4). Im Vergleich hierzu wies EspB_{EPEC} nur eine *coiled-coil* Domäne von I₁₈₇ – A₂₁₆ (Ausschlussgrenze 0,4) auf. *Coiled-coil* Strukturen ermöglichen Protein-Protein-Interaktionen zur Bildung von Homo- oder Heteromultimeren (Pallen et al. 1997). Diese Multimerisierungen spielen eine Rolle bei der Bildung von hochmolekularen Proteinstrukturen wie z.B. Flagellen oder Pili, und/oder sie ermöglichen kleinere oligomere Komplexe, wie sie für die Proteintranslokation benötigt werden (Pallen et al. 1997).

EspB_{EDL933} und EspB_{STEC413.89-1} enthalten nach Analyse der Sequenzen durch den Algorithmus PSORT (Nakai und Kanehisa, 1991) keine N-terminale Signal-Sequenz. Die Aminosäuresequenzen der beiden STEC-Stämme wiesen bei einem Vergleich mit Hilfe des gap-Algorithmus (GCG) eine Similarität von 84% auf, zwischen EspB_{EDL933} und EspB_{EPEC E2348/69} eine Similarität von 77% und zwischen EspB_{STEC413.89-1} und EspB_{EPEC E2348/69} 76,9%. In Abb. 10 wird ein Vergleich der aus den Nukleotidsequenzen ermittelten Aminosäuresequenzen mit EspB_{EPEC E2348/69} gezeigt. Ein von Sonnenberg et al. (Sonnenberg et al. 1993b) in EspB_{EPEC E2348/69} beschriebener mit 18 Serin- und Threonin-Resten in 38 Aminosäuren ungewöhnlich Ser/Thr-reicher Abschnitt im N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz konnte für die aus STEC ermittelten Sequenzen nicht bestätigt werden (s. 'Serin/Threonin'-Kasten in Abb. 10). Eine potentielle für Aminotransferasen typische Pyridoxal-Phosphat-Bindungsstelle in der Aminosäuresequenz von EspB_{EDL933} (Ala₁₃₅ - Ser₁₄₄) zeigte hingegen nur zwei Abweichungen von der Konsensussequenz des Motivs (s. 'PP-B'-Kasten in Abb. 10).

Abe et al. wiesen 1997 auf einen Deletionsbereich im C-Terminus von EspB im Vergleich mit der Aminosäuresequenz aus EPEC E2348/69 hin. In der Aminosäuresequenz aus EHEC EDL933 sind darin 8 von 12 Aminosäuren (s. Kasten 'Deletion' in Abb. 10), aus STEC 413.89-14 von 12 Aminosäuren deletiert.

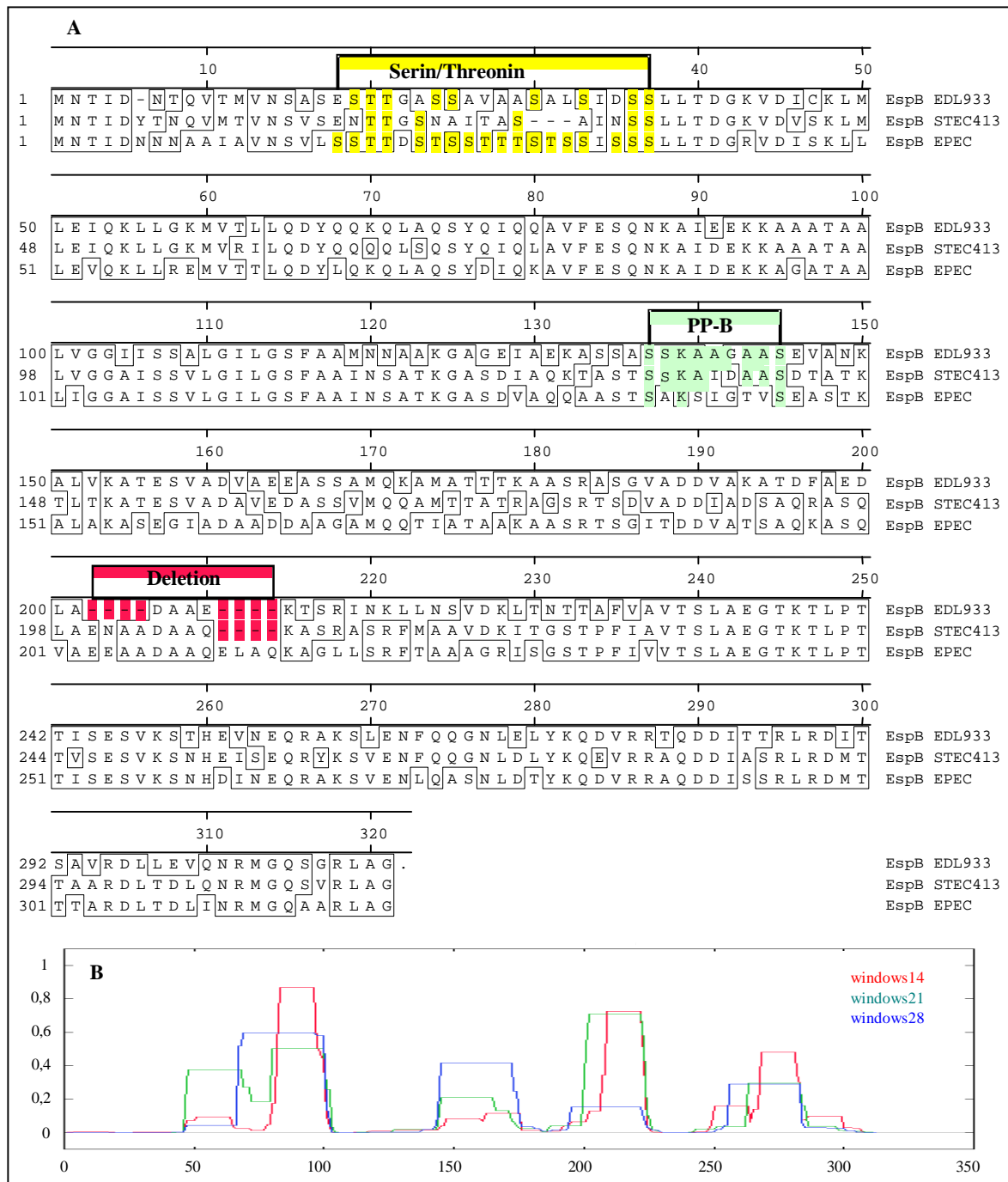


Abb. 10: Analyse konservierter Bereiche in EspB. (A) Die Aminosäuresequenzen von EspB aus EHEC EDL933 (EspB EDL933), STEC 413.89-1 (EspB STEC413) und EPEC E2348/69 (EspB EPEC) wurden mit Hilfe des Programms MegAlign (DNA-Star) und des Clustal-Algorithmus gegenübergestellt. EspB_{EDL933} wies im N-terminalen Bereich lediglich 9, EspB_{STEC413.89-1} nur 6 Ser/Thr-Reste im Vergleich zu 18 Ser/Thr-Resten in der Aminosäuresequenz von EspB aus EPEC E2348/69 auf. Die Übereinstimmungen mit dem Motive einer Pyridoxal-Phosphat-Bindungsstelle sind im Kasten 'PP-B' farbig unterlegt. Ein im Vergleich zur Aminosäuresequenz aus EPEC E2348/69 deletierter Bereich ist im Kasten 'Deletion' indiziert. (B) *Coiled-coil* Strukturen der Aminosäuresequenz EspB_{EDL933} wurden nach der Methode von Lupas et al. (Lupas et al. 1991) vorhergesagt. Die X-Achse gibt die Aminosäure-Position an, die Y-Achse die Wahrscheinlichkeit P einer *coiled-coil*-Struktur. Die Berechnungen wurden für die drei Aminosäure-Längen 14, 21 und 28 durchgeführt und werden als *windows14*, *windows21* bzw. *windows28* farbig markiert.

Die Recherche in verschiedenen Datenbanken ergab signifikante Homologien zu den Virulenzproteinen YopB (24% Similarität) aus *Yersinia* und SipB (39% Similarität) *Salmonella* (s. Tab. 15). YopB und SipB sind Virulenzfaktoren, die über das Typ III Sekretionssystem sekretiert werden (Galán, 1996; van Gijsegemetal. 1993; Hakanssonetal. 1996b). SipB wird in das Cytoplasma der Wirtszelle translokiert, wo es wahrscheinlich eine noch nicht definierte Effektorrolle innehat (Collazo und Galán, 1997). YopB wurde eingehend charakterisiert; dieses Protein wird in die Cytoplasmamembran der Wirtszelle integriert und fungiert zusammen mit YopD, das in das Cytoplasma der eukaryontischen Zelle translokiert wird, als Translokase für andere Effektorproteine aus *Yersinia*, wie YopE oder YpkA (Hakansson et al. 1996a; Francis und Wolf-Watz, 1998; Cornelis und Wolf-Watz, 1997). Homologien zu weiteren Proteinen sind ebenfalls in Tab. 15 aufgeführt.

2.2. Überexpression eines His'-EspB_{EDL933}-Fusionproduktes

Funktion und Lokalisation von EspB_{EDL933} waren zu Beginn der Dissertation nicht bekannt. Daher sollte durch Überexpression und Aufreinigung von EspB_{EDL933} mit Hilfe des QIAexpressionist-Systems (Qiagen) eine ausreichende Menge an Protein gewonnen werden, um Studien wie die Kopplung an Latex Beads und nachfolgende Bindungsstudien oder analog zum homologen Protein YopB aus *Yersinia* die porenbildende Eigenschaften des Proteins zu untersuchen. Die Klonierung von *espB*_{EDL933} erfolgte nach erfolgreicher Amplifikation des Gens durch k-PCR mit den Primern ANK6556/ANK6377 zunächst in pCR2.1 (pANK214). Die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz mit der Wildtypsequenz wurde mittels Sequenzierung beider Stränge bestätigt. Danach wurde *espB*_{EDL933} mit *Bam*HI und *Kpn*I aus pANK214 geschnitten, in pQE30 ligiert und in *E. coli* M15[pRep4] transformiert (AKSK227). Die Expression des resultierenden His'-EspB_{EDL933}-Fusionproduktes wurde durch die Analyse von 1,5 ml-Kulturen aus nicht-induzierenden (30°C ohne IPTG) und induzierenden (30°C mit 2 mM IPTG) Bedingungen bestätigt (s. Abb. 11). Das überexprimierte Fusionsprotein konnte hierbei in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Somit war die native Aufreinigung des His'-EspB_{EDL933}-Fusionsproteins möglich. Die Überexpression von His'-EspB_{EDL933} im großen Maßstab erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Das Zellpellet wurde mit einer French Press aufgeschlossen und über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Hierbei wurde ein Stufengradient mit steigender Imidazol-Konzentration (0 mM, 20 mM, 60 mM, 250 mM) angewandt. Vorversuche hatten ergeben, dass das Fusionsprotein ab einer Imidazol-Konzentration von ca. 60 mM schleppend eluierte. Um eine möglichst konzentrierte Proteinlösung zu erhalten, wurde daher 60 mM Imidazol als letzte Waschlösung eingesetzt und die Elution wurde mit einer drastischen Erhöhung auf 250 mM Imidazol initiiert. Die Proteinlösung nach der Dialyse gegen 1x PBS enthielt in geringem Maße Degradationsprodukte, wobei darauf zu verweisen ist, dass der Kulturüberstand des Wildtyps ebenfalls eine verkürzte Form von EspB aufweist (Ebeletal. 1996).

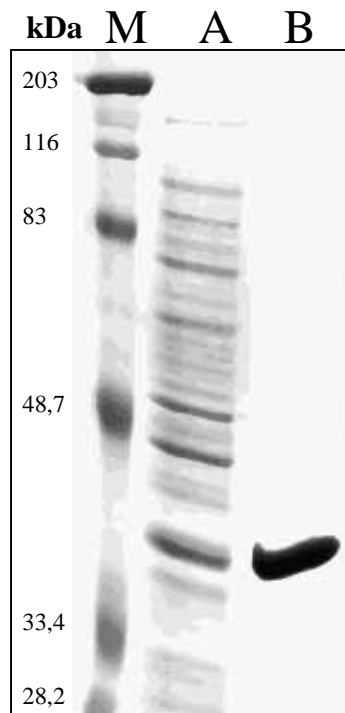


Abb. 11: Überexpression von $\text{EspB}_{\text{EDL933}}$. $\text{espB}_{\text{EDL933}}$ wurde in den Überexpressionsvektor pQE30 kloniert und als His'- $\text{EspB}_{\text{EDL933}}$ Fusionsprodukt überexprimiert. Die Aufreinigung erfolgte wie in 2.2. beschrieben. Aliquots wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. (M) Molekularer Standard, die Pfeile indizieren die angegebenen Molekulargewichte; (A) Rohextrakt der überexprimierten Kultur; (B) aufgereinigtes His'- $\text{EspB}_{\text{EDL933}}$ Fusionsprodukt nach Dialyse gegen PBS.

3. Klonierung und Sequenzierung der LEE-Sequenz zwischen *eaeA* und *espB* aus EHEC EDL933

In Veröffentlichungen über das bekannte Genlocus aus dem LEE von EPEC E2348/69 wurde gezeigt, dass zwischen dem für Intimin kodierenden *eaeA* und dem für das sekretierte Protein *EspB* kodierenden *espB* eine etwa 4,4 kb große Nukleotidsequenz vorhanden war, dessen genetischer Inhalt unbekannt war (McDaniel et al. 1995). Die Lokalisation dieses Bereiches innerhalb der Pathogenitätsinsel ließ jedoch die Vermutung zu, dass darin kodierte ORFs für die Virulenz notwendige Genprodukte enthalten konnten. Die erfolgreiche Sequenzierung von $\text{espB}_{\text{EDL933}}$ und die in der Datenbank zugängliche Nukleotidsequenz von *eaeA* aus EHEC EDL933 (*acc. no.* Z11541) lieferten gute Voraussetzungen für die Klonierung und Sequenzierung des Nukleotidsequenzbereichs zwischen *eaeA* und $\text{espB}_{\text{EDL933}}$. Hierzu wurden parallel zwei Versuchsansätze verfolgt, wobei wegen der großen Konkurrenz auf dem Gebiet von EPEC und STEC und damit der Notwendigkeit zur raschen Analyse der schnellere Weg weiter verfolgt wurde. Zwischen Ergebnisse aus der Erstellung einer Genbank aus EHEC EDL933 wurden daher verworfen. Die erhaltenen PCR-Produkte enthielten zwar die Gefahr von Amplifikationsfehlern, diese wurden jedoch im Laufe der Arbeit durch die Sequenzierung vieler hergestellter PCR-Produkte detektiert und eliminiert.

3.1. PCR-Amplifikation der $\text{IR}_{\text{EDL933}}$ -Sequenz

Die Amplifikation der Nukleotidsequenz zwischen *eaeA* und *espB* aus EHEC EDL933, im weiteren als $\text{IR}_{\text{EDL933}}$ bezeichnet, erfolgte mit Hilfe des Expand High Fidelity (EHF) PCR Kits, dessen Pwo DNA-Polymerase über ein gutes Proofreading verfügt. Als *eaeA* spezifischer Primer wurde der von Gannon et al. veröffentlichte Primer AE19 (Gannon et al. 1993), als *espB* spezifischer Primer der für die Deletion von $\text{espB}_{\text{EDL933}}$ vorgesehene Primer ANK7191

verwendet. Erst nach Verwendung von 2,5 mM Mg²⁺ und Zugabe von DMSO, welches bekanntlich die Sekundärstruktur von Nukleotidsequenzen aufzuheben vermag, in den Reaktionsansatz konnte eine erfolgreiche PCR-Amplifikation des gewünschten Bereiches auf der Basis von isolierter chromosomaler DNA durchgeführt werden. Die PCR wurde in parallelen Ansätzen mehrfach durchgeführt und die erhaltenen PCR-Produkte in pCRII kloniert. Ein als pANK84 bezeichnetes Plasmidkonstrukt wurde für die initiale Sequenzierung von IR_{EDL933} gewählt.

Tab. 14: Bedingungen für die Amplifikation von IR_{EDL933} durch PCR mit dem EHF-PCR-Kit

1 Zyklus	Denaturierung	94°C/120s
10 Zyklen	Denaturierung	94°C/15s
	Annealing	40°C/30s
	Extension	68°C/250s
20 Zyklen *	Denaturierung	94°C/15s
	Annealing	40°C/30s
	Extension	68°C/250s+20s
1 Zyklus	Extension	72°C/600s

* Die Extensionszeiten jedes Zyklus wurden um 20s zum vorherigen Zyklus erhöht.

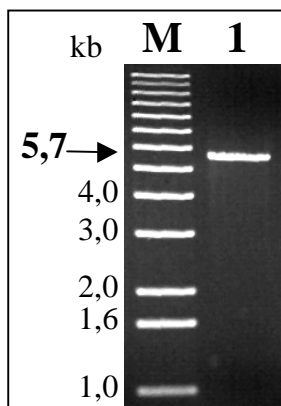


Abb. 12: PCR-Amplifikation von IR_{EDL933}. Unter den in Tab. 14 aufgeführten Bedingungen mit Zusatz von 2,5 mM Mg²⁺ und 1/50 Volumen DMSO erfolgte die Amplifikation der chromosomalen Nukleotidsequenz von der Position 1959 aus *aeA* (acc. no. Z11541) bis zur Position 263 aus *espB*_{EDL933} (acc. no. Y96953). Das PCR-Produkt wies eine Größe von 5651 bp auf. (M) Größenstandard; (1) PCR-Produkt. Die aus dem Gel ablesbare ungefähre Größe des PCR-Produktes ist durch einen Pfeil angegeben.

3.2. Unidirektionale Verkürzung und Sequenzierung von IR_{EDL933}

Auf Grund der Größe von IR_{EDL933} von 5651 bp war eine Sequenzierung allein anhand der vorhandenen Vektor- und PCR-Primer nicht möglich. Die "Primer-hopping" Methode von Straus et al. (1986) wäre zu zeit- und kostenintensiv gewesen, und so wurde die Methode der unidirektionalen Verkürzung nach Henikoff (Henikoff, 1984) mit Hilfe des double-stranded Nested Deletion Kits gewählt. Hierzu war zunächst die Wahl von Paaren geeigneter Restriktionsenzyme notwendig. Die Aktivität des Restriktionsenzym-Paares sollte möglichst innerhalb der MCS von pCRII auf der gleichen Seite relativ zum Insert verzeichnet sein, jedoch nicht in IR_{EDL933} schneiden und zudem die Eigenschaft besitzen, dass die aus dem Verdau resultierende Vektorseite dem Verdau durch ExoIII nicht zugänglich, die Insertseite des verdauten Plasmids jedoch dem Verdau durch ExoIII zugänglich war.

Zunächst wurden Restriktionskarten für pANK84 für verschiedene Restriktionsenzyme als Vorversuch zur Auffindung geeigneter schneidender Restriktionspaare angelegt. Die Wahl für die Restriktion und anschließende unidirektionale Verkürzung fiel schließlich auf die Restriktionsenzympaare *ApaI/NotI* (mit ExoIII sensitiver *NotI*-Seite) und *BamHI/KpnI* (mit ExoIII sensitiver *BamHI*-Seite). Nach erfolgter unidirektionaler Verkürzung von Aliquots von pANK84 erfolgten die Evaluierung geeigneter Deletionen mittels Gelelektrophorese und anschließend die Religation und Transformation der Fragmente in *E. coli XL1Blue*, die einen intakten Vektor und eine verkürzte IR_{EDL933}-Sequenz enthielten. Aus dieser Deletionsbank von IR_{EDL933} wurden geeignete Klone einer Plasmidpräparation unterzogen und die Plasmide mit den entsprechenden Vektorprimern sequenziert. Lücken in der Sequenzierung beider DNA-Stränge, die aus dem Fehlen geeigneter Deletionsklone resultierten, wurden durch die Verwendung zusätzlicher Primer in der Sequenzierung von pANK84 geschlossen. Somit konnte lückenlos die gesamte Nukleotidsequenz von IR_{EDL933} doppelsträngig bestimmt werden (s. Abb. 13). Die in IR_{EDL933} gefundenen ORFs werden in Abb. 13 ohne das unmittelbar upstream liegende *eaeA*, jedoch einschließlich *espB*_{EDL933} dargestellt. Die ermittelten Nukleotidsequenzen wurden in der EMBL-Datenbank unter den folgenden Zugangsnummern hinterlegt: *espB*_{EDL933}, X96953; *espB*_{STEC413.89-1}, X99670; IR_{EDL933}, Y13068.

TTCCATAACC	A	CCCCGGCTA	AAATATGTAT	TGTTTTAGCC	GGGG	CATAAT	TATTTCTTCT	60	
TAAGAAATAA	CCTCTTATAA	TCAAATCTAC	TACTGGTCTT	TTTATCTGCT	TAATAGGTCT			120	
CTTTCAAAGA	GACACATTCA	CGTTTTCTCA	TGTAGGTTGA	TCCAACCACG	CTGATACCAA			180	
AGCTGAATCA	CATCAAGCAA	CAACTATGCT	CACAACATCC	ACACAATAAA	AAACCCTCCG			240	
AAGAGGGGGA	AGAGGATAAG	AAATTAATAC	GACAGTGGA	TATGTATATA	TTCGTCTGGG			300	
CGGGAGATGT	TGATACCATC	TTTAGGATCA	ATCGCGTCTA	TGACATAGCC	TCCTTTTCTA			360	
R S I	N I G D	K P D	I A D	I V Y G	G K L			420	
ATGCTACCAA	TCCCCAGGCT	GGTGCCATTA	TCAAGAGCAA	TTGTTGGATT	CTTCATCGTA			480	
I S G	I G L S	D G N	D L A	I T P N	K M T			540	
CCGCTGATTC	TGAGTATTTT	TCCGGGGAAA	ATATCTGCTG	AAATGTACGG	CTGAATGTTT			600	
G S I	R L I K	G P F	I D A	S I Y P	Q I N			660	
TGAAAGAGTA	TCTTGGCGTT	ACTATTTTGT	TTCATTGTCAT	TTATAATGGC	AAGGATCTTA			720	
Q F L	I K A N	S N K	N M A	N I I A	L I K			780	
CTCTCATTTCT	GTTGAGAAAC	TTCCCCCGCA	ACAATGATGA	CATCATTCTT	TTTGGAAATA			840	
S E N	Q Q S V	E G A	V I I	V D N K	K F I			900	
TTGACATAGT	TTATTAGTTT	ATTCTTTTAA	AACTCTGATG	CCAGTTTCAT	GATTTTATTG			960	
N V Y	N I L K	N K K	F E S	A L E N	I K N			1020	
TTACTGTGTG	TGTGTATTTT	CCATCCTGCA	ACTCCTGGCG	TATTCAGTAA	CAGATTTTCA			1080	
S S N	N H I E	W G A	V G P	T N L L	L N E			1140	
ACCTCGTCC	ATTTGGGTGA	AGGGGGAATG	TATCCCGATA	ACAGAAAGAA	TCCAGGCTTA			1200	
V E S	W K P S	P P I	Y G S	L L F F	G P K			1260	
TTACCTTTTG	TAATAATGAT	ATCTTTGTAA	CCGTATTCCG	TTAAGACATC	ATTAATTGCG			1320	
N G K	T I I I	D K Y	G Y E	T L V D	N I A			1380	
GATATGATTT	GGTTATTTGA	AATGATATTA	TTGTAATAAA	AAATATTTTT	TTCTTTTAGG			1440	
S I I	Q N N C	I I N	N Y Y	F I N K	E K L			1500	
TAATTAATAA	ATGGAGTTAA	ATCCGTGGTT	GATTCGCAAC	GCCCATAAAG	CGCGATATTT			1560	
Y N F	F P T T	S E C	R G Y L	A I N				1620	
TTCCCATGCC	ATACCAGAGT	GATTGCATGA	AGTTTGTTTT	CTTTTAGCTG	CTGATATACA			1680	
K G H	W V L T	I A H	L K N	E K L Q	Q Y V			1740	
TCAGCTCTGG	TAAACGTTGG	GGGTTTCAGCT	TTTGGGGAAA	GCAAAACGTA	ACTGCCGATG			1800	
D A R	T F T P	P E A	K P S	L L V Y	S G I			1860	
GCACCAGACA	ACGCAAAAGT	AGCACCAATC	ACGCTCGCCA	GGATAAGGCG	TTTTTTGCGT			1920	
A G S	L A F T	A G I	V S A	L I L R	K K R			1980	
CGACTTTTGG	CAGAGAACCT	TTCTGGCACA	TCAGACAATG	GCAAGGAATG	GTCAATATCA			2040	
R S K	A S F R	E P V	D S L	P L S H	D I D			2100	
CCAATGATGA	AGCAACATCC	CGCTATATCA	ATAACCTTTC	CGACAGGTAA	TGGTTTATCT			2160	
G I I	F C C G	A I D	I V K	G V P L	P K D			2220	
GCTTCATAGG	GCGTGGGTTG	CCCATCAATC	CAAAATTCAA	CCGGAGATAA	AAGGAAAACA			2280	
A E Y	P T P Q	D I W	F E V	P S L	L F V			2340	
CCTTCCTCAC	GTATATCAAG	TAAAACTGA	TTGAGGCCTT	GTTCAAGGGG	AAAGTAAACA			2400	
G E E	R I D L	L F Q	N L G	Q E L P	F Y V			2460	
ATATCCTTAC	CTTCCGTACC	TAGCGTTAGG	TTTCCCATCG	GAAGTTGTAA	TTCCCGATTA			2520	
I D N	D E T G	L T L	N G M	P L Q L	E R N			2580	
CGCATCGCAC	CATTGAGAGG	TTTTATTTTA	TATGAGGATA	ACATTTTTTA	ATTTTATTCA			2640	
R M A	G N L L	K I K	Y S S	L M				2700	
TCCTGGTGGT	TGAACAATGA	GAAAAAATAT	GGTGAACTTA	CATCGTCTAA	GAATAGAGTA			2760	
GAAAGGAAGC	TGTTGTACAG	TACTATTTAA	TGGAATATTC	ATAATTAATG	ATTACGTGAG			2820	
TTTCCAAATG	CTAATGGTAT	TGAATTTAAT	CAAAACCCCG	CATCTGTTTT	TAATTCTAAT			2880	
M A	N G I	E F N	Q N P A	S V F	N S N			2940	
TCATTAGATT	TTGAATTAGA	ATCTCAGCAA	TTAACGCAAA	AAAATCTTCT	TAATATTTCT			3000	
S L D F	E L E	S Q Q	L T Q K	N S S	N I S			3060	
TCGCCATTAA	TAAATTTGCA	AAATGAATTA	GCAATGATTA	CTAGTTCATC	GCTTTCTGAA				
S P L I	N L Q	N E L	A M I T	S S S	L S E				
ACGATTGAAG	GGCTAAGCCT	GGGATATCGC	AAAGGTAGCG	CAAGGAAAGA	AGAGGAAAGG				
T I E G	L S L	G Y R	K G S A	R K E	E E G				
TCGACAATCG	AGAAGCTGCT	CAATGATATG	CAAGAGCTGC	TTACTCTTAC	CGATAGTGAT				
S T I E	K L L	N D M	Q E L L	T L T	D S D				
AAAAATAAAG	AACTATCATT	AAAAACAGC	GGGCTGCTGG	AACAACACGA	TCCTACTTTG				
K I K E	L S L	K N S	G L L E	Q H D	P T L				
GCGATGTTTG	GCAACATGCC	AAAGGGGGAA	ATTGTTGGCG	TAATATCTTC	TTTATTGCAA				
A M F G	N M P	K G E	I V A L	I S S	L L Q				
TCTAAGTTTG	TTAAGATTGA	ATTAATAAAG	AAATATGCCA	GGTTATTATT	AGATTATTAT				
S K F V	K I E	L K K	K Y A R	L L L	D L L				
GGCGAAGATG	ATTGGGAGCT	GGCTCTGCTT	TCCTGGTTAG	GGGTGGGTGA	GTAAATCAG				
G E D D	W E L	A L L	S W L G	V G E	L N Q				
GAAGGTATCC	AGAAGATCAA	GAAGCTTTAT	GAAAGGCTGA	AGGATGAGGA	TTCTGAAAAT				
E G I Q	K I K	K L Y	E K A K	D E D	S E N				
GGCGCCTCTT	TACTTGACTG	GTTTATGGAG	ATTAAGGATC	TTCCCGAGCG	TGAGAAGCAC				
G A A S L	L D W	F M E	I K D L	P E R	E K H				
TTAAASGTCA	TTATTAGGCG	GCTGTCTTCT	GATCTCTCTT	ATATGTCTTC	TTTGAAGAC				
L K V I	I R A	L S F	D L S Y	M S S	F E D				
AAAGTAAAGA	CTCTTCAAT	TATTAGTGAT	TTATGCGAGG	TAATCATTTT	TTTATCACTT				
K V K T	S S I	I S D	L C R V	I I F	L S L				
GATAACTATG	CAGATATTAT	TTCGATCTCT	ATTAAGAAAG	ATAAAGATAT	CATTTTAAAT				
D N Y A	D I I I	S I S	I K K D	K D I	I L N				
GAAGTGTAT	CGATTATTGA	ACATGTCTGG	CTAACAGAAG	ACTGGTTGCT	GGAGAGTCCCT				
E V L S	I I E	H V W	L T E D	W L L	E S P				
TCTCGGGTAT	CGATTGTCTGA	AGATAAACAT	ATTTATTATT	TTCATTTATT	GAAAGACTTT				
S R V S	I V E	D K H	I Y Y F	H L L	K D F				
TTTACATCAT	TACCAGATGC	TTGCTTTTAT	GATAGTGAGC	AGAGAGAGAA	TGCATTATTA				
F T S L	P D A	C F I	D S E Q	R E N	A L L				
ATGATTGGTA	AAGTTATCGA	CTATAAGGAG	GAAATATTAT	GATATTAATT	ACTCAATAAT				
M I G K	V I D	Y K E	E I I *						
TTTTTTTGTTT	TCCTGAGAAA	AATTATCAAG	AGGTATATAG	ATGATACAT	CAAATGCAAC				
ATCCGTTGTT	AATGTGAGTG	CGAGTTCCTTC	GACATCGACG	ATCTATGACT	TAGGTAATAT				
S V V	N V S A	S S S	T S T	I Y D L	G N M				
GTCGAAGGAT	GAGGTGGTTA	AGCTATTTGA	AGAATCTGGT	GTTTTTCAGG	CTGCGATTCT				
S K D	E V V K	L F E	E L G	V F Q A	A I L				
CATGTTTTCT	TATATGTATC	AGGCACAAAG	TAATCTGTGC	ATTGCAAAAGT	TTGCTGATAT				
M F S	Y M Y Q	A Q S	N L S	I A K F	A D M				
GAATGAGGCA	TCTAAAGCGT	CAACCACGGC	ACAAAGATG	GCTAATCTTG	TGGATGCCAA				
N E A	S K A S	T T A	Q K M	A N L V	D A K				
AATTGCTGAT	GTTTCAGAGTA	GCACGTGATA	GAATGCGAAA	GCCAAACTTC	CTCAAGACGT				
I A D	V Q S S	T D K	N A K	A K L P	Q D V				

pas

sepL

espA

GATTGACTAT	ATAAACGATC	CACGTAATGA	CATAAGTGTA	ACTGGTATTC	GTGATCTTAG	3120	<i>espa</i>
I D Y	I N D P	R N D	I S V	T G I R	D L S	3180	
TGGTGATTTA	AGCGCTGGTG	ATCTGCAAAC	AGTGAAGGCG	GCTATTTTCAG	CTAAAGCGAA	3240	
G D L	S A G D	L Q T	V K A	A I S A	K A N	3300	
TAACCTGATA	ACGGTAGTGA	ATAATAGCCA	GCTCGAAATT	CAGCAAATGT	CGAATACATT	3360	
N L T	T V V N	N S Q	L E I	Q Q M S	N T L	3420	
AAATCTCTTA	ACGAGTGCAC	GTTCTGATGT	GCAATCTCTA	CAATATAGAA	CTATTTTCAGC	3480	
N L L	T S A R	S D V	Q S L	Q Y R T	I S A	3540	
AAATATCCCTT	GGTAAATAAC	CGGAGATAAC	TATGCTTAAC	GTAAATAACG	ATACCCCTGTC	3600	
I S L	G K *		M L N	V N N D	T L S	3660	
TGTAACGTCT	GGGGTTAATA	CCGCCTCGGG	TACTTCTGGT	ATTACTCAAT	CTGAAACGGG	3720	<i>espd</i>
V T S	G V N T	A S G	T S G	I T Q S	E T G	3780	
TTTATCGCTG	GATTTACAAC	TGGTTAAATC	CATGAACCTCG	TCAGCAGGCT	GGACAGAAAG	3840	
L S L	D L Q L	V K S	M N S	S A G W	T E S	3900	
TAGCCCTTTA	CCGACGCCGC	CGGCAGGTCA	CTCATTAGTG	ACGCCCTCTG	CTGCTGAGGA	3960	
S P L	P T P P	A G H	S L V	T P S A	A E D	4020	
TGTCCTTAGT	AAATTGTTTG	GTGGTATTAG	TGGTGAGGTT	ACAAGTCGCA	CTGAGGAGGC	4080	
V L S	K L F G	G I S	G E V	T S R T	E E A	4140	
AGAGCCACAG	CGCACAAGCT	ATCCCTATCT	CTCTCAGGTG	AATACCGTTG	ACCCTCAGCA	4200	
E P Q	R T S Y	P Y L	S Q V	N T V D	P Q Q	4260	
AATGATGATG	TGTTCACTC	TGTTATCCCT	GGATACTTCC	GCGCAGAAAG	CTCTCGAGTC	4320	<i>espB</i>
M M M	M V T L	L S L	D T S	A Q K V	S S L	4380	
GAAAACTCT	AACGAGATT	ATATGGATGG	GCAAACATAA	GCGCTGGAGA	ATAAAACGCA	4440	
K N S	N E I Y	M D G	Q T K	A L E N	K T Q	4500	
GGAGTATAAA	AAACAGCTCG	AAGAACAACA	GAAAGCCGAA	GAGAAATCAC	AAAAAGTAA	4560	
E Y K	E Q L E	K A E	K A E	E K S Q	K S K	4620	
AAATGTTGGC	CAGGTCTTTG	GTTGGTTGGG	CGTCGCATTA	ACAGCCGTTG	CCGCTGTTTT	4680	
I V G	W L F G	V L G	V A L	T A V A	A V F	4740	
TAACCCAGCA	CTCTGGGCTG	TTGTTGCCAT	TGGTGCAACA	GCAATGGCAC	TGCAAACGGC	4800	
N P A	L W A V	V A I	G A T	A M A L	Q T A	4860	
AGTGATGATA	ATGGGGGAAA	ATGCCCCCTCA	GGGATTAAAG	ACTGCAGCAC	AGGTCTTTGG	4920	<i>espD</i>
V D V	M G E N	A P Q	G L K	A A Q	V F G	4980	
CGGAATATCT	ATGGCCGCAA	GCATTCTGAC	AGCCGGCGTT	GGCGGGGTGT	CTTCACTGTT	5040	
G I S	M A A S	I L T	A G V	G G V S	S L L	5100	
ACCTAAATTT	GGTAATGTTG	CTAACAAAAT	TGGCTCAAGC	GTTGTAAAAG	TCGTTGAGAA	5160	
P K F	N N V A	N K I	G S S	V V K V	V E K	5220	
GGCGGCAGAA	GCCTGGTTA	AAAACGTTTT	TGCAAAAATT	TCGACAGTGG	CTGAGGGCGT	5280	
A A E	A L V K	N V F	A K I	S T V A	E G V	5340	
TACGAACGGT	ATTCGTTCTG	CCGGGACAAC	TGCGTTGAAT	AATGAGGCTG	CGCAACTCCA	5400	
T N G	I R S A	G T T	A L N	N E A A	Q L Q	5415	
AATGTTGTCT	CAGTTAGCTG	CTTTCGCGGT	GCAAAACCTA	ACTCGACAGA	GTGAAAGCTT		
M L S	Q L A A	F A V	Q N L	T R Q S	E S L		
AGGTGAGAGT	CGGAAGCTCG	AGCTGGATAA	AGCGGCAAGC	GAGTTACAAA	ATCAGGCGAG		
G E S	A K L E	L D K	A A S	E L Q N	Q A S		
CTATTACAA	AGTGTTCCTC	AACTGATGTC	CGATTACGCA	CGGGTAAATA	GTCGTATTGT		
Y L Q	S V S Q	L M S	D S A	R V N S	R I V		
TAGTGGCCGA	ATTTAATTAT	TAAAGAGAAT	TTTATAATGA	ATACTATTGA	TAATACTCAA		
S G R	I *		M N	T I D	N T Q		
GTAACGATGG	TTAATTCGCG	TTCGGAGAGT	ACGACGGCG	CTTCCAGTGC	AGTTGCCGCA		
V T M V	T S A S	S E S	T T G A	S S A	V A A		
TCTGCTTTAT	CAATTGATTC	ATCTCTGCTT	ACTGATGGTA	AGGTTGATAT	TTGTAAGCTG		
S A L S	I D S	S L L	T D G K	V D I	C K L		
ATGCTGGAAA	TTCAAAAAC	CCTCGGCAAG	ATGGTGACTC	TATTGCAGGA	TTACCAACAA		
M L E I	Q K L	L G K	M V T L	L Q D	Y Q Q		
AAACAATTGG	CGCAAAGCTA	TCAGATTTCAG	CAGGCCGTTT	TTGAGAGCCA	GAATAAAGCT		
K Q L A	Q S Y	Q I Q	Q A V F	E S Q	N K A		
ATTGAGGAAA	AAAAAGCCGC	GGCAACCGCT	GCTTTGGTGT	GCGGGATTAT	TTCATCAGCA		
I E E K	K A A	A T A	A L V G	G I I	S S A		
TTGGGGATCT	TAGGTTCTTT	TGCAGCAATG	AACAACGCGG	CTAAAGGGGG	TGGTGAGATT		
L G I L	G S F	A A M	N N A	K G A	G E I		
GCTGAAAAAG	CAAGCTCTGC	ATCTTCAAAG	GCTGCTGGTG	CGGCTTCTGA	GTTTGCAAAT		
A E K A	S S A	S S K	A A G A	A S E	V A N		
AAAGCTCTGG	TCAAGGCTAC	GGAAAAGTGT	GCTGATCTGC	CAGAGGAGGC	ATCCAGTGCG		
K A L V	K A T	E S V	A D V A	E E A	S S A		
ATGCAGAAAG	CGATGGCCAC	AACAACGAAA	GCAGCCAGCC	GTGCATCTGG	CGTTGCAGAT		
M Q K A	M A T	T T K	A A S R	A S G	V A D		
GATGTTGCGA	AAGCCACTGA	CTTTGCTGAA	GATCTTGCA	ACGCCGCCGA	GAAGACAAGC		
D V A K	A T D	F A E	D L A D	A A E	K T S		
AGAATCAATA	AGTTGTTGAA	TTCCGTAGAT	AAACTGACCA	ATACCACAGC	ATTTGTTGCC		
R I N K	L L N	S V D	K L T N	T T A	F V A		
GTGACCAGTC	TTGCTGAAGG	TACGAAAACG	TTGCCAACAA	CAATATCTGA	GTCCGTCAAA		
V T S L	A E G	T K T	L P T T	I S E	S V K		
TCGACTCATG	AGGTTAATGA	ACAACGTGCG	AAGTCGCTGG	AAAACCTCCA	GCAGGGGAAT		
S T H E	V N E	Q R A	K S L E	N F Q	G G N		
CTGGAGCTGT	ATAAACAGA	CGTTCGCAGA	ACGCAGGATG	ATATCACGAC	TCGTCTGCGT		
L E L Y	K Q D	V R R	T Q D D	I T T	R L R		
GATATAACGT	CCGTGTCCG	CGATCTCCTT	GAGGTCCAGA	ATCGTATGGG	GCAATCGGGT		
D I T S	A V R	D L L	E V Q N	R M G	Q S G		
CGCTTAGCTG	GGTAA						
R L A G	*						

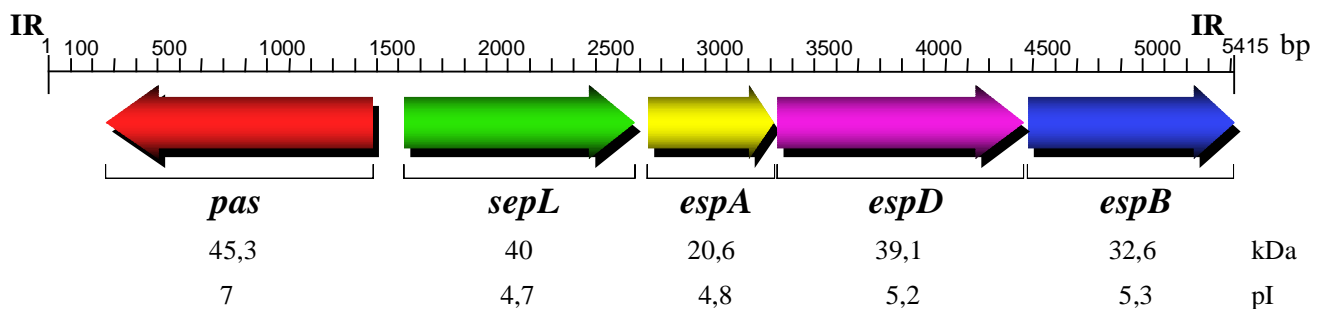


Abb. 13: Nukleotidsequenz und ORF-Karte von IR_{EDL933}. Die Nukleotidsequenz zwischen *eeA* und einschließlich *espB* aus EHEC EDL933 wurde durch PCR-Amplifikationen, Klonierungen, unidirektionale Verkürzungen und Sequenzierungen ermittelt. (A) Dargestellt sind die Nukleotidsequenz downstream des Stopcodons von *eeA*, die vorhergesagten Gene *pas*_{EDL933}, *sepL*_{EDL933}, *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} mit der translatierten Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode unterhalb der Nukleotidsequenz. Startcodons sind fettgedruckt, Stopcodons als Sterne in der translatierten Aminosäuresequenz eingezeichnet, potentielle ribosomale Bindungsstellen sind unterstrichen und ein rho-unabhängiger Terminator 12-44 bp downstream vom Stopcodon von *eeA* eingerahmt. (B) Schematische Darstellung der ORFs und Indikation der zugehörigen vorhergesagten Molekulargewichte und pI-Werte.

3.3. Sequenzvergleich der in IR_{EDL933} kodierten Aminosäuresequenzen

Die Homologien der einzelnen ORFs aus IR_{EDL933} mit Proteinen anderer Mikroorganismen auf der Ebene der translatierten Aminosäuresequenzen in Tab. 15 wurden mit Hilfe der im Kapitel Material und Methoden angegebenen Algorithmen (s. 0.) und der aktuellen Datenbanken (Stand Januar 1999) sowie von Übersichtsartikeln (van Gijsegem et al. 1993; Hueck, 1998) zusammengestellt. Zu vermerken ist, dass viele der hier angegebenen Sequenzen erst im Laufe dieser Dissertation veröffentlicht worden sind.

Tab. 15: Homologien zu Gen-Produkten der IR_{EDL933}-Sequenz

	Protein	Organismus	% Identität	% Similarität	aa	accessionno.
P a s	Pas	STEC413.89-1	97	98	406	Y13859
	EscD	EPECE2348/69	97	97	406	AF022236
	SsaD	<i>Salmonella typhimurium</i>	23	36	339	AJ224892*
	PscD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22	40	289	U56077
	YscD	<i>Yersinia pestis</i>	21	40	419	M83225
	YscD	<i>Yersinia enterocolitica</i>	21	39	418	Q01245
	hemU-1	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	40	65	35	AE001075
	FhuB	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	50	62	32	AJ007906
S e p L						
	SepL	EPECE2348/69	94	98	351	AF022236
	SepL	STEC413.89-1	93	95	351	Y13859
	SepL	REPECB10	92	95	166	AF054421*
	SsaL	<i>Salmonella typhimurium</i>	27	46	327	P74854 ⁺
	DnaK	<i>Leptospira interrogans</i>	30	49	93	P71442 ⁺
	Smc1	<i>Methanococcus jannaschii</i>	28	50	117	A64505 [#]
	FliD	<i>Borrelia burgdorferi</i>	22	41	305	AE001126
	M-Protein	<i>Streptococcus pyogenes</i>	25	43	87	AF052425
	NisB	<i>Lactococcus lactis</i>	22	42	195	P20103 ⁺

E s p A	EspA	STEC413.89-1	85	88	192	Y13859
	EspA	EPECE2348/69	80	89	192	AJ022236
	EspA	RDEC-1(Kanninchen)	85	94	192	U80908
	EspA	EPECO128:H2(Vogel)	84	93	192	AJ225021
	EspA	EPECO119:H2(Vogel)	84	94	192	AJ225015
	EspA	EPECO111:H2(Vogel)	84	93	192	AJ225018
	EspA	EPEC1390(Schwein)	84	94	191	AF064683
	SseB	<i>Salmonellatyphimurium</i>	32	51	131	AF020808
	SAP	<i>Campylobacterfetus</i>	21	42	193	L15800
	YepTM	<i>Yersiniaenterolitica</i>	25	42	129	L33467
	FliC	<i>Salmonellacholeraesuis</i>	23	42	124	S09637
	FliC	<i>Salmonellatyphimurium</i>	27	49	99	L21912
E s p D						
	EspD	EHECEDL933	99	99	374	AF071034
	EspD	STEC413.89-1	74	84	380	Y13859
	EspD	EPECE2348/69	73	82	380	AF022236
	EspD	DA-EPEC-3431O8:H ⁻	85	90	380	Y17874
	EspD	DA-EPEC-B6O26:K60	73	84	380	Y17875
	IpaB	<i>Shigelladysentery</i>	22	39	298	Q03945 ⁺
	IpaB	<i>Shigella flexneri</i>	22	39	298	P18011 ⁺
	PepB	<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	23	44	242	AF035922
	SipB	<i>Salmonellatyphimurium</i> SPI1	22	42	307	U25631
	SipB	<i>Salmonellatyphi</i> SPI1	22	42	307	X82670
	SseC	<i>Salmonellatyphimurium</i> SPI2	26	48	102	AF020808
E s p B	YopB	<i>Yersiniaenterolitica</i>	24	40	337	P37131 ⁺
	YopB	<i>Yersiniapestis</i>	25	42	335	AF053946
	EspB	EHECEDL933	99	99	312	AF071034
	EspB	STEC413.89-1	70	82	317	Y13859
	EspB	EPECE2348/69	61	77	321	AF022236
	EspB	EPEC1390(Schwein)	70	82	317	AF064683
	EspB	EPEC85/150	70	83	303	AF059713
	EspB	EPEC4221(Hund)	59	75	321	U65681
	SipB	<i>Salmonellatyphimurium</i> SPI1	22	39	263	U25631
	SipB	<i>Salmonellatyphi</i> SPI1	22	39	263	X82670
	McpC	<i>Salmonellatyphimurium</i>	21	40	234	Q02755 ⁺
	YopB	<i>Yersiniaenterolitica</i>	17	24	406	P37131 ⁺
	YopB	<i>Yersiniapestis</i>	17	24	406	AF053946
	tail fibre protein GP37	<i>E.coli</i>	23	37	282	D90774
	tail fibre protein homolog	<i>Yersiniapestis</i>	21	42	244	AF053947

*SequenzinderDatenbanknichtvollständig

⁺SwissProt-Datenbank

[#]Pir-Datenbank

4. Charakterisierung von EspA

Im Laufe der Arbeiten mit der IR_{EDL933}-Sequenz und der Herstellung von Deletionsmutanten wurde von Kenny et al. das Protein EspA aus EPEC E2348/69 vorgestellt, das über den Typ III Sekretionsmechanismus sekretiert wurde und dessen Deletion zu einer Minderung der Adhäsion von EPEC an eukaryontische Zellen führte (Kenny et al. 1996). Die Fortführung der Arbeiten an EspA aus EHEC EDL933 sollte zur Aufklärung der Bedeutung dieses Proteins sowie zu einer Zuordnung einer möglichen Funktion im Pathogenitätsprozess von EHEC beitragen.

4.1. Sequenzanalyse von *espA*_{EDL933}

Die Lage von *espA*_{EDL933} innerhalb der IR_{EDL933}-Sequenz wird in Abb. 13 dargestellt. EspA_{EDL933} weist 88% bzw. 94,8% Identität zur Aminosäuresequenz von EspA aus EPEC E2348/69 bzw. STEC 413.89-1 auf. Die Homologien zu EspA aus anderen pathogenen *E. coli* sowie zu Proteinen anderer Bakterien sind in Tab. 15 aufgeführt. Die Analyse ergab für die 192 aa von EspA_{EDL933} ein theoretisches Molekulargewicht von 20574 Da, einen pI von 4,78 und eine Transmembranvorhersage von zwei putativen membrandurchspannenden Regionen (aa 3-23 und aa 37-57), die jedoch als nicht sicher zu bewerten sind. Dagegen zeigen auf eukaryontische Systeme abgestimmte Vorhersagen der Topologie Wahrscheinlichkeiten von $P=0,370$ für die mitochondriale innere und äußere Membran sowie $P=0,681$ für die mitochondriale Matrix. Wie EspB_{EDL933} besitzt EspA_{EDL933} keine N-terminale Signalsequenz und bestätigt somit die Feststellung, dass das sekretierte Protein EspA aus STEC das Methionin des Startcodons beibehält und über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleust wird (Ebel et al. 1996). Wie für EspA_{EPEC E2348/69} beschrieben (Kenny et al. 1996), ist der N-Terminus von EspA_{EDL933} durch eine Threonin- und Serin-reiche Aminosäuresequenz (11 der ersten 20 Aminosäuren) charakterisiert. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz von EspA_{EDL933} zeigt im Bereich von Arg₁₄₀ bis Thr₁₈₄ eine *coiled-coil* Domäne, die mit einem Motiv aus Flagellin-Molekülen verschiedener Bakterien signifikante Homologien aufweist. Es wird vermutet, dass dieses Flagellinspezifische Motiv für die Multimerisierung der Proteinmoleküle verantwortlich ist (Lupas et al. 1991). Tatsächlich konnten für EspA aus STEC 413.89-1 multimere Formen nachgewiesen werden (Ebel et al. 1998).

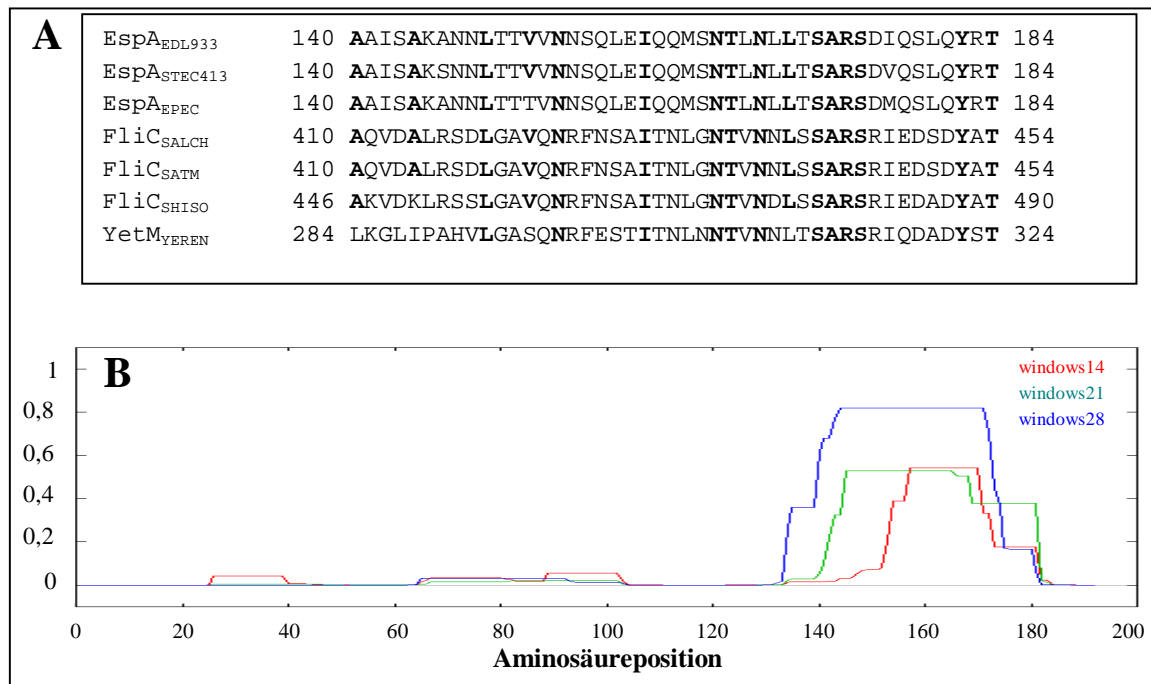


Abb. 14: Konservierung eines *coiled-coil* Motivs in *espA*_{EDL933}. (A) Sequenzvergleiche zeigten auf, dass ein konservierter Bereich in den bekannten *E. coli* *spA*-Sequenzen sowie in verschiedenen Flagellin-Sequenzen vorhanden ist, woraus sich eine Konsensussequenz extrahieren ließ. EspA_{EDL933}, EHEC EDL933; EspA_{STEC413}, STEC 413.89-1; EspA_{EPEC}, EPEC E2348/69; FliC_{SALCH}, *Salmonella choleraesuis*; FliC_{SATM}, *Salmonella typhimurium*; FliC_{SHISO}, *Shigella sonnei*; YetM_{YEREN}, *Yersinia enterocolitica*. (B) Die Vorhersage von *coiled-coil* Strukturen in der Aminosäuresequenz von EspA_{EDL933} ergab ein deutliches Signal für den Bereich zwischen A₁₄₀ und T₁₈₅. Diese Domäne stimmt mit dem gefundenen konservierten Bereich der Flagelline überein. *Coiled-coil* Strukturen wurden mit Hilfe des Algorithmus von Lupas et al. (Lupas et al. 1991) vorhergesagt. Die X-Achse gibt die Aminosäure-Position an, die Y-Achse die Wahrscheinlichkeit *P* einer *coiled-coil*-Struktur. Die Berechnungen wurden für die drei Aminosäure-Längen 14, 21 und 28 durchgeführt und werden als *windows 14, 21* bzw. *28* farblich markiert.

4.2. Konstruktion einer *in-frame* Deletionsmutante von *espA*_{EDL933}

Kenny et al. konnten zeigen, dass eine Deletionsmutante von *espA* in EPEC E2348/69 zwar an eukaryontische Zellen zu adhären vermochte, die für die Bildung von Aktin enthaltenden Pedestals notwendige Signaltransduktion jedoch unterbunden war (Kenny et al. 1996). Auch Abe et al. fanden an nicht-polaren Stopcodon-Mutanten, dass *espA* für die Adhärenz von RDEC-1 an HeLa-Zellen nicht notwendig war (Abe et al. 1997). Beide Untersuchungen ließen jedoch eine exakte Funktion für EspA offen. Daher sollte die Bedeutung von EspA_{EDL933} für die Infektion von EHEC EDL933 an HeLa-Zellen und eventuell eine genauere Funktion durch die Konstruktion einer *in-frame* Deletionsmutante bestimmt werden. Hierzu wurden zunächst durch k-PCR von EHEC EDL933 mit den Primer-Paaren ANK9188/ANK9187 bzw. ANK9186/ANK9185 zwei Fragmente amplifiziert, deren Amplifikationsprodukt aus einer OE-PCR mit den Primern ANK9188 und ANK9185 ein Deletionsprodukt von *espA*_{EDL933} (Δ *espA*_{EDL933}) ergab. Δ *espA*_{EDL933} enthielt die ersten 63 bp des 5'-Endes und die letzten 66 bp des 3'-Endes von *espA*_{EDL933} (s. Abb. 15). Somit wurden 450 bp von *espA*_{EDL933} deletiert. Δ *espA*_{EDL933} wurde in pCR2.1 (pANK82) kloniert und durch Sequenzierung auf die Richtigkeit der

Nukleotidsequenz sowie eines durchgängigen Leserahmens überprüft. $\Delta espA_{EDL933}$ wurde anschließend als *KpnI/XbaI*-Fragment in pANK111 ligiert (pANK111) und in *E. coli* S17-1 (λpir) transformiert. Der Transfer von pANK111 in EHEC EDL933 erfolgte durch Konjugation bei 30°C. Richtige Transkonjuganten von EHEC EDL933, die pANK111 enthalten sollten, wurden auf LB-Platten mit Chloramphenicol selektiert und mittels k-PCR auf die Existenz von $espA_{EDL933}$ und $\Delta espA_{EDL933}$ durch die Primer ANK9188/ANK9185, des Megaplasids pO157 durch die Primer EHEC-hly1/EHEC-hly5 sowie auf *stx1* und *stx2* durch die Primer ANK8111/ANK8112 und ANK8113/ANK8114 untersucht. Somit ergaben sich genügend Hinweise auf das Vorliegen von EHEC EDL933 mit pANK111. Die Kointegration des Plasmids in das Chromosom des rekombinanten EHEC-Stammes wurde dadurch erreicht, dass vereinzelte Klone bei 44°C auf LB-Medium mit Chloramphenicol angezogen wurden. Das temperatur-sensitive Replikon des Suizidvektors pMAK700oriT wird bei 44°C nicht repliziert, so dass lediglich in das Chromosom integrierte Kopien mit dem Umsatz des Chromosoms mitrepliziert werden, Klone mit extrachromosomalen pMAK700oriT-Derivaten gehen dagegen durch die Selektion auf Chloramphenicol verloren. Die Excision des Deletionsplasmids erfolgte durch die Inkubation der selektierten Kointegrate in LB-Medium ohne Zugabe von Antibiotika bei 30°C für einen Tag, und anschließend wurden Klone ohne pMAK700oriT-Derivat mittels Replika-Verfahren (LB-Medium mit und ohne Chloramphenicol) bei 30°C selektiert. Der Erhalt einer *in-frame* Deletionsmutante von $espA_{EDL933}$ (EHEC EDL933 $\Delta espA$) wurde durch eine k-PCR mit den außerhalb des $\Delta espA_{EDL933}$ -Konstrukts situierten Primern ANK25 und ANKA289 bestätigt. EHEC EDL933 $\Delta espA$ wies hierbeinurein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 934 bp für das Deletionsfragment enthaltende Chromosom auf (s. Abb. 15).

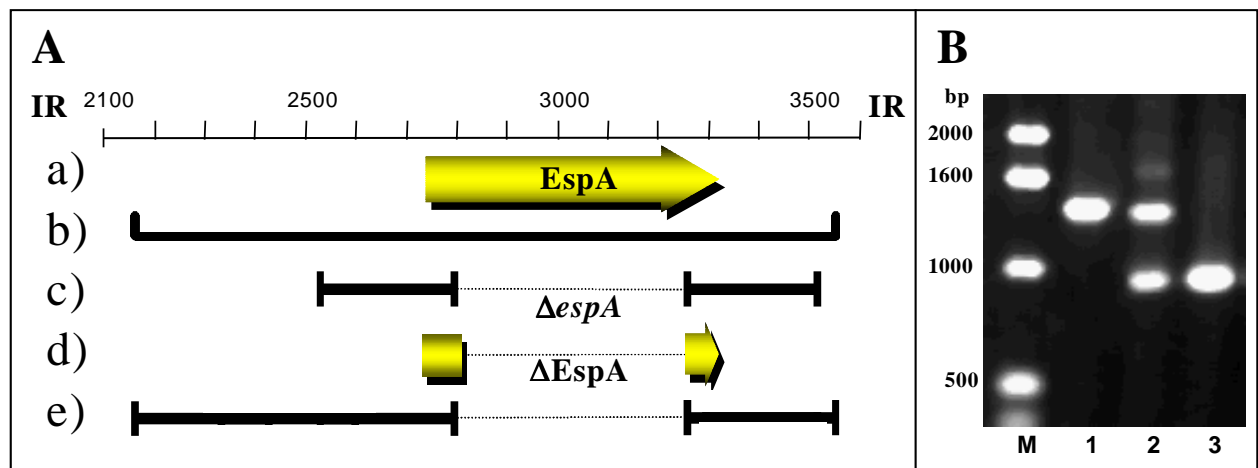


Abb. 15: Schematische Darstellung der Deletion von $espA_{EDL933}$. (A) Gestrichelte Linien im Schema zeigen deletierte Bereiche an. (a) Position von $espA$ innerhalb der *IR* $_{EDL933}$ und Größe des Translationsprodukts; (b) Position des aus den externen Primern ANK25 und ANKA289 resultierenden PCR-Produkts des Wildtyps; (c) Position der aus den Deletionsprimern resultierenden Deletionsfragmente; (d) Position des deletierten ORFs und Größe des Translationsprodukts; (e) Position des aus den externen Primern ANK25 und ANKA289 resultierenden PCR-Produkts von EHEC EDL933 $\Delta espA$. (B) Mit den Primern ANK25 und ANKA289 generierte PCR-Produkte: 1, Wildtyp EHEC EDL933; 2, Kointegrat EHEC EDL933::pANK111; 3, EHEC EDL933 $\Delta espA$.

4.3. Analyse der sekretierten Proteine von EHEC EDL933 $\Delta espA$

Zur immunologischen Analyse von EspA_{EDL933} wurde der von Ebel et al. hergestellte monoklonale Maus-Antikörper B71 (mAb B71) verwendet. Dieser basiert auf der Elektroelution von EspA nach der Auftrennung sekretierter Proteine von STEC 413.89-1. Die N-terminale Analyse von EspA_{STEC 413.89-1} hatte ergeben, dass EspA_{STEC 413.89-1} nicht prozessiert wurde, demnach also ein Kandidat für die Sekretion mittels des Typ III Sekretionssystems war (Ebel et al. 1996). Um die isogene Deletion in *espA*_{EDL933} zu überprüfen, wurden die sekretierten Proteine der Mutante EHEC EDL933 $\Delta espA$ einer Western Blot Analyse unterzogen. Es zeigte sich, dass EHEC EDL933 $\Delta espA$ kein EspA_{EDL933}, allerdings auch keine durch die Deletion verkürzte Variante von EspA_{EDL933} sekretierte (s. Abb. 16). Die Sekretion der downstream von *espA*_{EDL933} kodierten Proteine EspD_{EDL933} und EspB_{EDL933} waren indes nicht unterbunden.

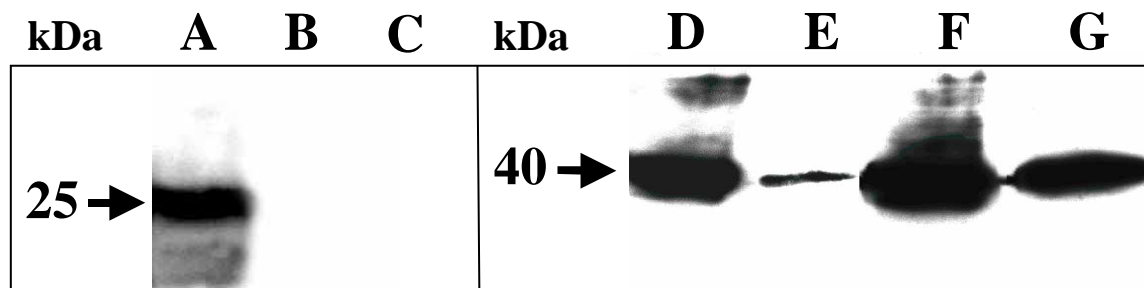


Abb. 16: Sekretions- und Expressionsmuster von EHEC EDL933 $\Delta espA$. Die Überstände 'aktivierter' Kulturen von EHEC EDL933 (A) bzw. der Deletionsmutante EHEC EDL933 $\Delta espA$ (B, D und F) wurden TCA-gefällt und jeweils 30 µg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Entsprechend wurden jeweils 30 µg Gesamtextrakt aus EHEC EDL933 $\Delta espA$ in den Spuren C, E und G aufgetragen. Die Detektion der Proteine EspA_{EDL933} (A, B und C), EspD_{EDL933} (D und E) und EspB_{EDL933} (F und G) erfolgte mit Hilfe der in Tab. 9 angegebenen monoklonalen Antikörper. Die Molekulargewichte der Hauptprodukte sind durch Pfeile angegeben.

4.4. Adhärenz und Invasivität von EHEC EDL933 $\Delta espA$

Um die Auswirkungen des Fehlens von EspA_{EDL933} während der Infektion von EHEC EDL933 $\Delta espA$ mit HeLa-Zellen abzuschätzen, wurden Infektionsversuche von EHEC EDL933 $\Delta espA$ im Vergleich zum Wildtyp-Stamm durchgeführt. Hierfür wurden in 24-well Platten HeLa-Zellen angezogen und in einem MOI von 100:1 mit den Bakterien infiziert. Jede Versuchsreihe wurde in mindestens drei parallelen Ansätzen durchgeführt. Die Plattierungsergebnisse ließen auf die Zahl adhärenter und intrazellulärer Bakterien schließen, wobei der geringe Anteil intrazellulärer Bakterien in diesem Versuch vernachlässigbar war. Im separaten Invasionsversuch, indem die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin abgetötet werden, wurde die tatsächliche Zahl intrazellulärer Bakterien ermittelt. In beiden Versuchen erwies sich die EspA_{EDL933}-Mutante in ihrer Infektiosität erheblich beeinträchtigt. Im Vergleich zum Wildtyp adhärierte die Deletionsmutante mit 0,5% vergleichbar schlecht wie der als Negativ-Kontrolle eingesetzte *E. coli*-Stamm XL1 Blue. Die Invasivität mit 8,7% gegenüber

dem Wildtyp war weniger stark beeinträchtigt, was den Anteil intrazellulärer Bakterien/CFU adhärenter Bakterien von 0,5% beim Wildtyp-Stamm auf 9% bei der $\Delta espA$ -Mutante verlagerte. Dies bedeutet eine Steigerung der Invasivität um das 18fache.

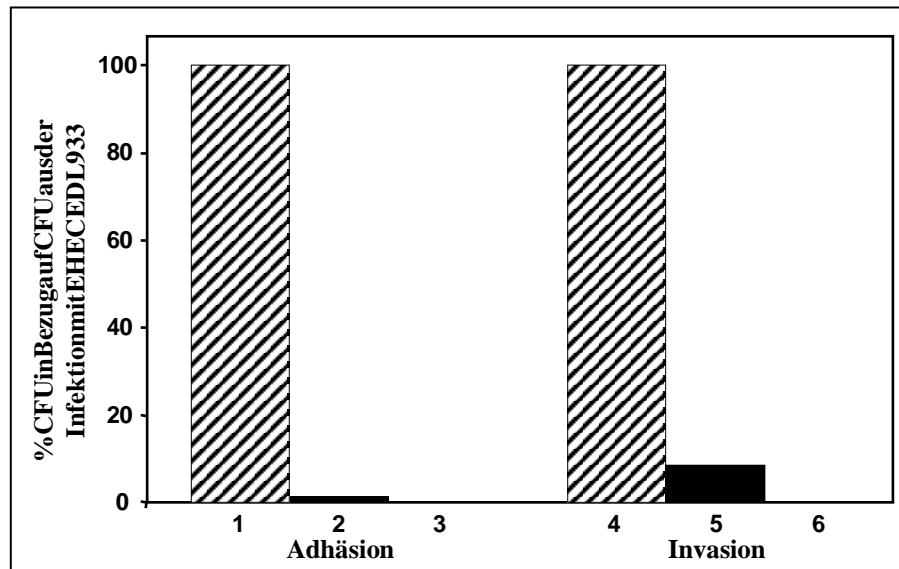


Abb. 17: Adhäsion und Invasion von EHEC EDL933 $\Delta espA$. Der Wildtyp EHEC EDL933 (1 und 4), und die $espA_{EDL933}$ -Mutante EHEC EDL933 $\Delta espA$ (2 und 5) wurden auf ihre Fähigkeiten, an HeLa-Zellen zu adhären (1-3) bzw. HeLa-Zellen zu invadieren (4-6), getestet, wie in II.6.1. beschrieben. Als Negativkontrolle für den Invasionstest wurde *E. coli* XL1Blue (3 und 6) eingesetzt. Die Zahl determinierter Kolonie-bildender Einheiten (CFU) wurde prozentual zu den ermittelten Werten des Wildtypstamms EHEC EDL933 angegeben. Die Differenzen zwischen der $espA_{EDL933}$ -Mutante und dem Wildtyp waren statistisch signifikant ($P \leq 0,05$).

Tatsächlich zeigten Goosney et al., dass EPEC die Phagozytose durch J774-A1-Zellen inhibierte, was stark vom Typ III Sekretionssystem und von den sekretierten Proteinen EspA, EspD und EspB abhängig war. Die Invasion von nicht-phagozytischen Zellen durch EHEC EDL933 ähnelte einer Makropinocytose, bei der Aktin-beteiligte Oberflächenbewegungen zur Aufnahme von Objekten führt. Vorstellbar ist, dass EHEC der Makropinocytose, die durch die enge Adhäsion und die starke Reorganisation von Aktin ausgelöst werden könnte, mittels antiphagozytischen Faktoren entgegenwirkt, da ein langfristiges Überleben in der Wirtszelle scheinbar nicht möglich ist.

4.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 $\Delta espA$ -infizierten HeLa-Zellen

Die eng verbundene Adhäsion von EHEC EDL933 an HeLa-Zellen ist mit der eukaryontischen Akkumulation von Aktin direkt unterhalb der Bakterien gekoppelt. Phalloidin-FITC gefärbte infizierte HeLa-Zellen zeigten somit Bereiche starker Färbung direkt unterhalb der meisten adhärenter Bakterien. Im Gegensatz hierzu konnte für EHEC EDL933 $\Delta espA$ nachgewiesen werden, dass kaum Bakterien an die HeLa-Zellen adhärten, was die in 4.4. gefundenen Resultate bestätigte, und dass zufällig adhärrierende Bakterien keine Aktin-Akkumulation

bewirkten und keine dreidimensionalen Mikrokolonien ausbildeten (s. Abb. 18), was in dieser Hinsicht die Befunde der EPEC- und RDEC-1-Mutanten untermauerte.

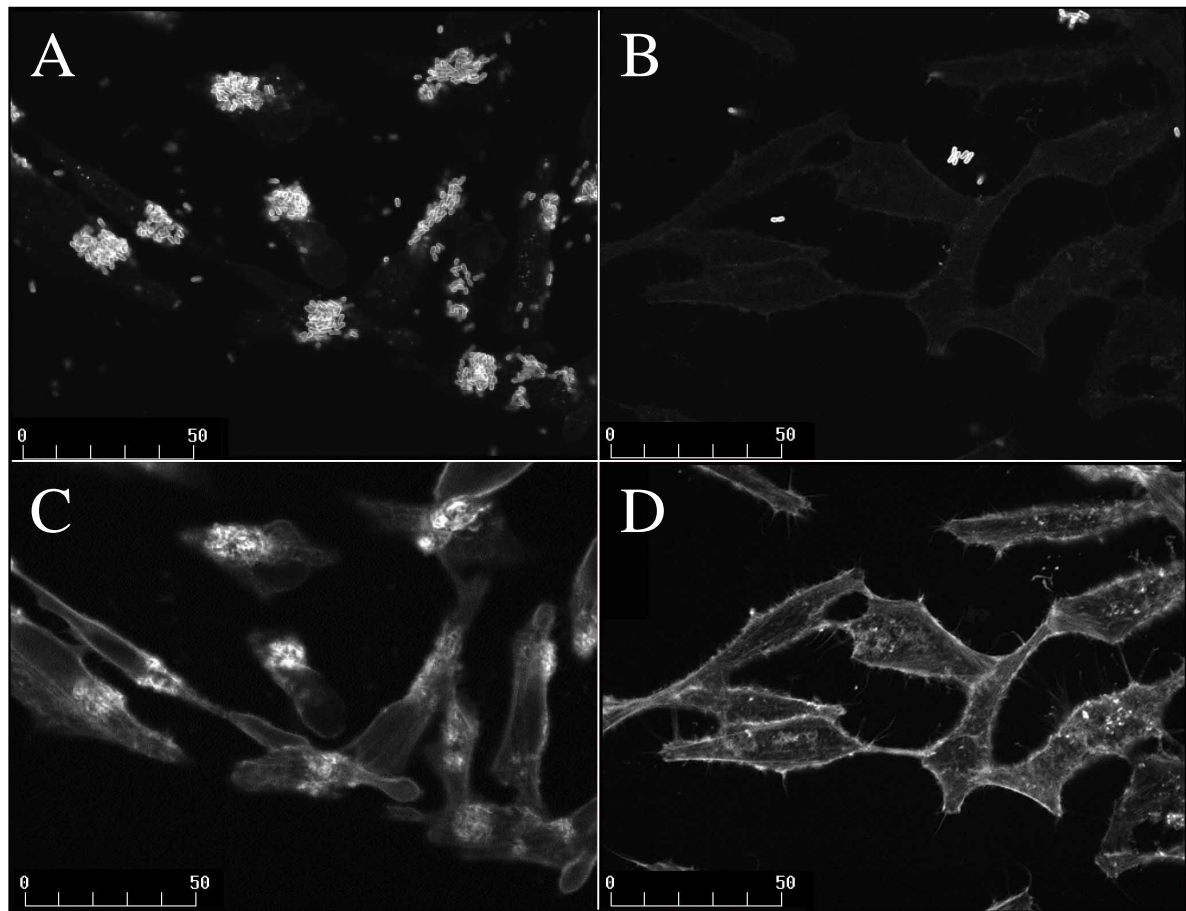


Abb. 18: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Adhärenz von EHEC EDL933 $\Delta espA$. HeLa-Zellen wurden mit dem Wildtyp EHEC EDL933 (A und C) sowie der Deletionsmutante EHEC EDL933 $\Delta espA$ (B und D) infiziert. Die Bakterien wurden mit AS-anti-O157 und TRITC-markierten Antikörpern, F-Aktin mit FITC-markiertem Phalloidin gefärbt. Die Analyse durch Immunfluoreszenzmikroskopie belegte, dass EHEC EDL933 $\Delta espA$ nicht an eukaryontischen Zellen anhaftete. Skalierung in μm .

Wurden die Infektionsproben weniger stringent gewaschen, so konnten wenige EHEC EDL933 $\Delta espA$ auf den HeLa-Zellen detektiert werden. Diese Bakterien induzierten allerdings keine Aktinakkumulation (s. Abb. 19).

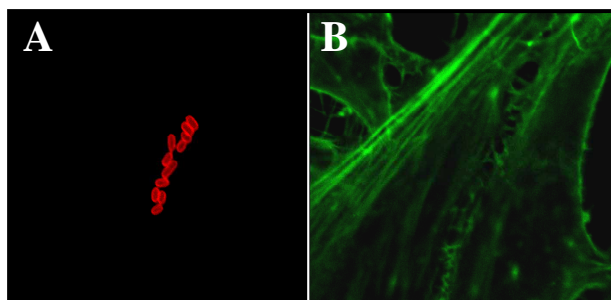


Abb. 19: EDL933 $\Delta espA$ auf HeLa-Zellen. (A) Die Bakterien wurden mit AS-anti-O157 und TRITC-gekoppeltem sekundären Antikörper, (B) Aktin mit FITC-gekoppeltem Phalloidin markiert.

4.6. Elektronenmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 $\Delta espA$ -infizierten HeLa-Zellen: Charakterisierung von *surface appendages*

Die Einschränkung von EHEC EDL933 $\Delta espA$, an HeLa-Zellen zu adhären, wurde durch die rasterelektronenmikroskopische Analyse weiter bestätigt. Eine aussagekräftige Änderung der Morphologie konnte nicht sofort getroffen werden, da eine zu geringe Anzahl an Bakterien bei der Infektion mit EHEC EDL933 $\Delta espA$ vorhanden war (s. Abb. 20).

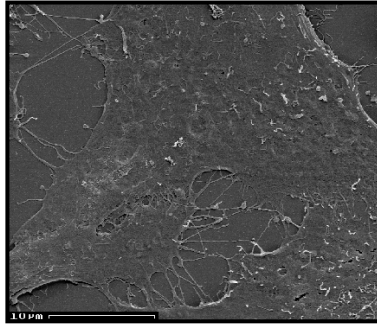
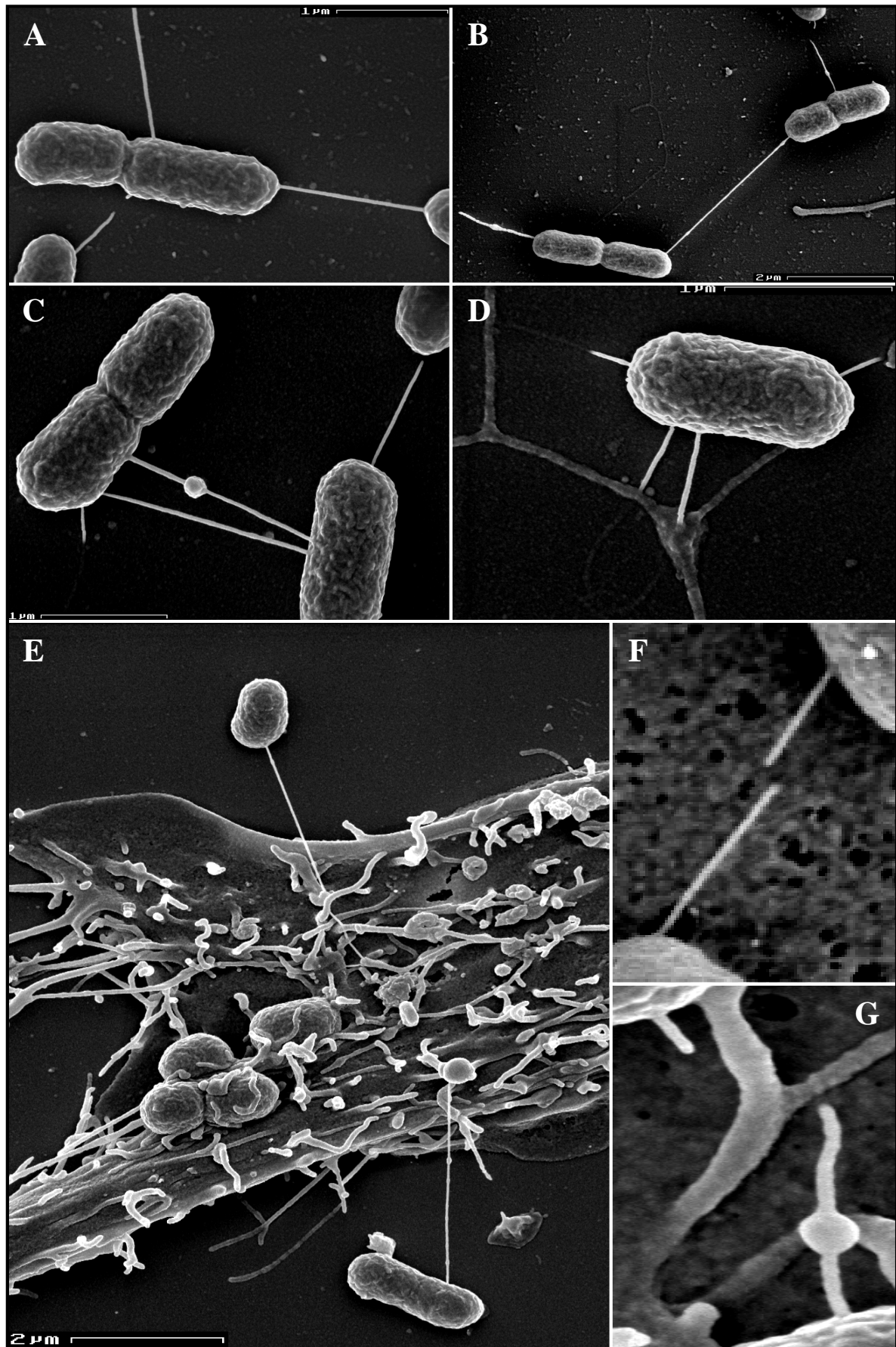


Abb. 20: Infektion von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 $\Delta espA$. Die Infektion von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 $\Delta espA$ erfolgte über 6 h. Die rasterelektronenmikroskopische Analyse bestätigte die Befunde aus 4.5., dass die in $espA_{EDL933}$ deletierte Mutante nicht an HeLa-Zellen adhärte.

Es war allerdings aufgefallen, dass der Wildtyp EHEC EDL933 fädige Strukturen ausbildete, die sowohl Bakterien miteinander verbanden, als auch Bakterien in Verbindung mit den HeLa-Zellen brachten (s. Abb. 21). Die intermediären Filamente hatten einen Durchmesser von etwa 30 nm und waren daher etwa halb so dünn wie die Mikrovilli der HeLa-Zellen. Ungefähr 10% der frei im Medium befindlichen Bakterien standen durch gerade, offensichtlich starre intermediäre Filamente in Kontakt, wobei selten mehr als drei Filamente der mehrfachen Länge eines Bakteriums von einer Zelle ausgingen (s. Abb. 21A und B). Manche der Filamente enthielten einzelnerunde Verdickungen (s. Abb. 21C). Die Filamente verbanden auch Bakterien mit den eukaryontischen Zellen. Hierbei dienten meistens mikrovillöse Ausläufer der Eukaryonten als Verbindungspunkt (s. Abb. 21D), aber auch die scheinbar direkte Verbindung von der Bakterienoberfläche zur Wirtszelle war zu beobachten (s. Abb. 21F und G). Der Kontakt zwischen Bakterien und Wirtszellen erfolgte bisweilen wie beim interbakteriellen Kontakt über Längen von mehr als 2 μ m (s. Abb. 21E und H). Die Analyse der Infektionen zeigte jedoch auch einen Bakterium-Zell-Kontakt mit sehr viel kürzeren Filamenten (s. Abb. 21I) oder sogar nicht-filamentöse *surface appendages* (s. Abb. 21J). Ebenfalls gezeigt wurde, dass ein einzelnes Bakterium gleichzeitig mehrere Filamentlängen aufweisen konnte (s. Abb. 21K).



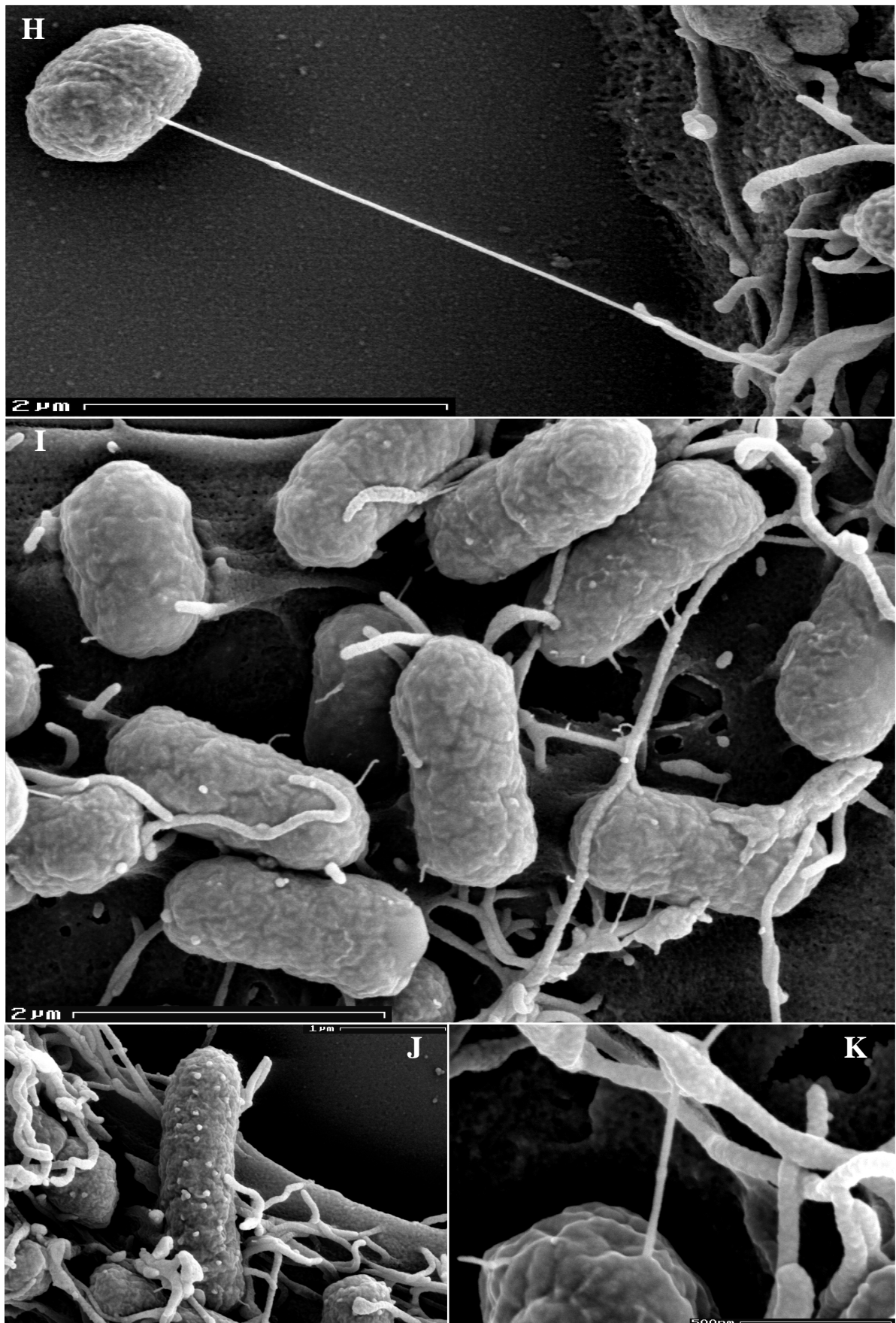


Abb. 21: Rasterelektronenmikroskopische Analyse der *surface appendages* von EHEC EDL933. *Surface appendages* vermittelnden Kontakt zwischen Bakterien und eukaryontischen Zellen. EHEC EDL933 wurde für die 'Aktivierung' der Typ III Sekretionssystem abhängigen Sekretion Infektions-relevanter Faktoren für 3 h in Zellkulturmedium mit HEPES bei 37°C und 5% CO₂ stehend angezogen. Die Infektion der HeLa-Zellen erfolgte mit einer MOI von 100:1 über 4 h und wurde anschließend mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. (A und B) Frei im Medium befindliche Bakterien wiesen intermediäre Filamente auf. (C) Manche Filamente enthielten runde Verdickungen. Der Bakterien-Zell-Kontakt über Filamente verlief über mikrovillöse Ausläufer der Eukaryonten (D) oder über von der Bakterienoberfläche zur Wirtszelle (F und G). Bisweilen erreichten Filamente des Bakterien-Zell-Kontaktes Längen über 2 µm (E und H), häufiger jedoch waren kürzere Filamente (I) oder sogar nicht-filamentöse *surface appendages* zu beobachten (J). Ein individuelles Bakterium konnte Filamente verschiedener Längen besitzen (K).

Für EHEC wurden bis dahin keine Pilus-ähnlichen Ausläufer beschrieben, auf die diese Fortsätze hingewiesen hätten. *Bundle forming pili* wie in EPEC fehlenden EHEC-Stämmen nachweislich (Gunzburg et al. 1995). Infektionen von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 $\Delta espA$, bei denen das Waschen bewusst drastisch eingeschränkt wurde, um die extrem schwach adhärierende Deletionsmutante in unmittelbarer Nähe zu den Zellen zu bewahren, sollten zeigen, ob sich die Deletion von *espA*_{EDL933} auf die Bildung dieser Filamente auswirkte. Die rasterelektronenmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 $\Delta espA$ bewies, dass der Wildtyp-Stamm diese Strukturen ausbildete (s. Abb. 22A), während der *espA*_{EDL933}-Mutante die Strukturen fehlten (s. Abb. 22B). Die wahrscheinlich für die Infektion notwendigen Strukturen werden im Folgenden als *surface appendages* bezeichnet.

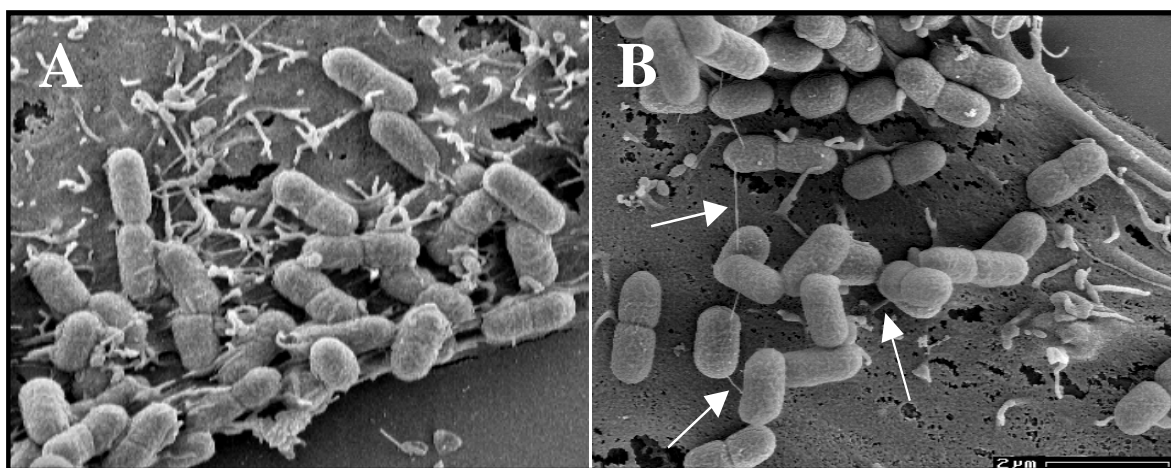


Abb. 22: Elektronenmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 $\Delta espA$. Bei Infektionen von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 $\Delta espA$ wurden die Kammern nur schwach gespült, um zufällig anhaftende Bakterien in ihrer Position zu erhalten. Es konnte so gezeigt werden, dass in Folge der Deletion von *espA*_{EDL933} die Bakterien keine Filamente ausbildeten (A), während der Wildtyp EHEC EDL933 unter den gleichen Bedingungen Filamente produzierte (B, Pfeile).

4.7. Nachweis von EspA-Filamenten

Das Fehlen der filamentösen Strukturen auf EHEC EDL933 $\Delta espA$, die Konservierung der *coiled-coil* Domäne in EspA und die damit verbundenen Homologien zu Flagellin-Molekülen

wie auch die Sekretion des Proteins ließen die Schlussfolgerung zu, dass EspA_{EDL933} möglicherweise indirekter Weise in der Bildung der *surface appendages* (s. 4.6.) involviert war. Somit sollte EspA_{EDL933} durch immun- und immunfluoreszenzmikroskopische Techniken nachweisbar sein.

Eine Suspension von EHEC EDL933 wurde nach 'Aktivierung' bzw. EHEC EDL933 auf infizierten HeLa-Zellen wurde nach erfolgter Infektion in einer Doppelfärbung mit dem O157-Serotyp spezifischen Antiserum und mit dem EspA_{EDL933} spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper B71 markiert. Das Aktin-Gerüst der HeLa-Zellen wurde mit Phalloidin-FITC angefärbt. Tatsächlich konnte EspA_{EDL933} mittels konfokaler Lasermikroskopie sowohl auf den Bakterien als auch als Ausläufer von der Oberfläche der Bakterien, mitunter von Zelle zu Zelle, nachgewiesen werden (s. Abb. 23). Der *espA*_{EDL933}-Mutante dagegen fehlten solche dreidimensionalen Strukturen (s. Abb. 23). Hiermit konnte gezeigt werden, dass EspA_{EDL933} in der Tat in der Bildung von *surface appendages* involviert war. Die entdeckten Strukturen werden im weiteren Verlauf als EspA-Filamente bezeichnet.

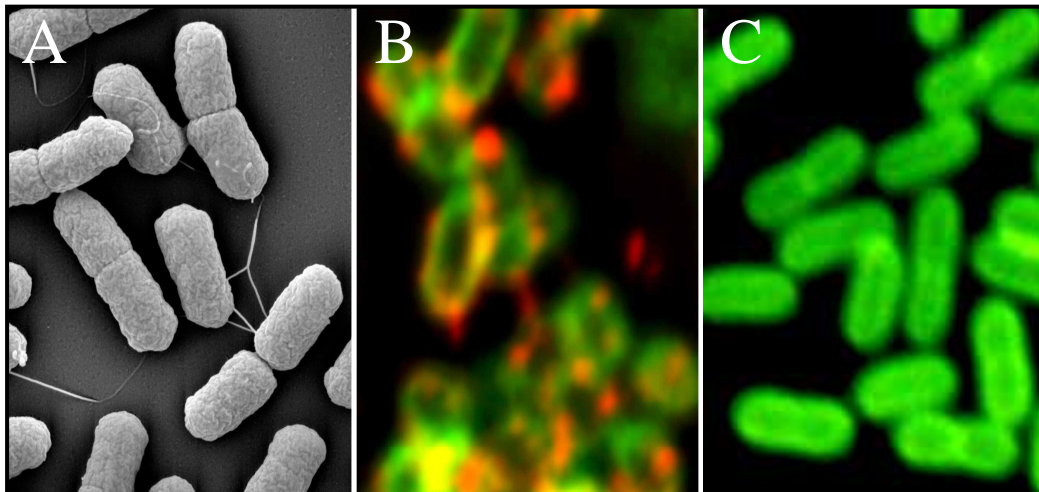


Abb. 23: Nachweis der Beteiligung von EspA_{EDL933} an der Bildung von *surface appendages*. (A) Die Infektion von HeLa-Zellen mit dem 'aktivierten' Wildtypstamm EHEC EDL933 zeigte in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung die erwarteten filamentösen Ausläufer. (B) Eine parallel durchgeführte immunfluoreszenzmikroskopische Analyse, in der die Bakterien mit dem O157-Serotyp spezifischen Antiserum und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper, EspA_{EDL933} mit Hilfe des mAb B71 sowie eines TRITC-konjugierten sekundären Antikörpers gefärbt wurden, offenbarte, dass die gebildeten Filamente EspA_{EDL933} enthielten. Hingegen belegten (C) rasterelektronenmikroskopische und (D) immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Infektionen mit EHEC EDL933 $\Delta espA$, dass diese Filamente nicht von der Deletionsmutante gebildet wurden.

Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen der vertikal-optischen Ebene (x, z-Sektionen) mittels konfokaler Lasermikroskopie lieferten den Nachweis, dass die EspA-Filamente einen direkten Kontakt der Bakterien zu den Wirtszellen verschafften (s. Abb. 24).

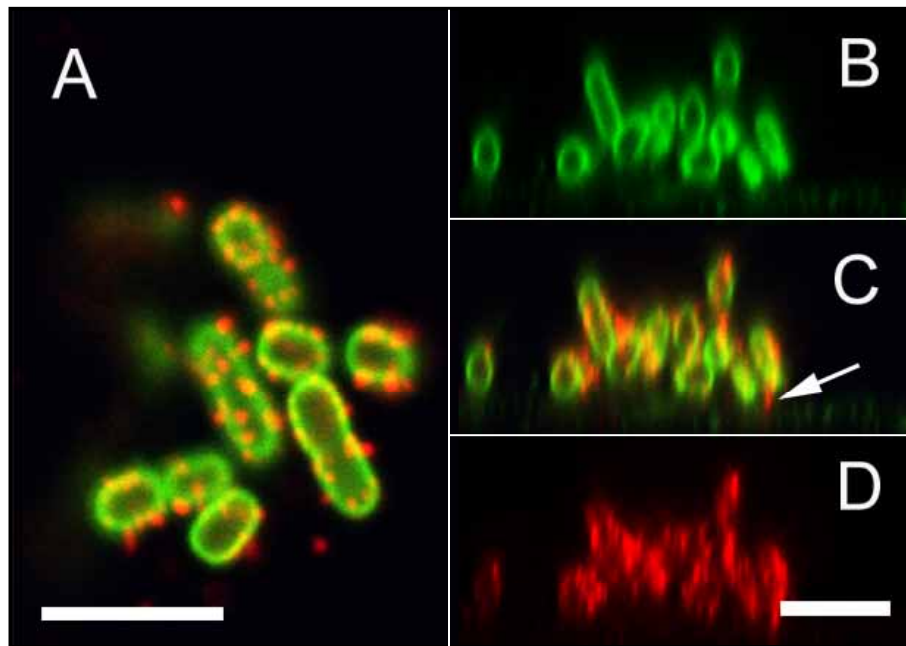


Abb. 24: Nachweis des Bakterien-Zell-Kontaktes über EspA-Filamente mittels vertikaler Sektion. HeLa-Zellen wurden für 5 h mit STEC 413.89-1 inkubiert, fixiert und permeabilisiert. Für die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse wurden die Bakterien mit einem Serotyp spezifischen Antiserum und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper, EspA_{EDL933} mit Hilfe des mAb B145 sowie eines TRITC-konjugierten sekundären Antikörpers gefärbt, und das Aktin der HeLa-Zellen wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin markiert. (A) EspA ist fokal über die Oberfläche der Bakterien verteilt. (B-D) Die parallele x,z-Sektionierung der gleichen Probe zeigt (B) die Verteilung der Bakterien in der Mikrokolonie und (D) die Verteilung des EspA-Proteins auf der Oberfläche der Bakterien. (C) Overlay von (B) und (D). Der Pfeil in (D) indiziert ein EspA-Filament, das einen Kontakt zur eukaryontischen Zelle etabliert. Die Balken indizieren jeweils 5 μm. (Foto: F. Ebel)

Dass diese EspA enthaltenden Strukturen die Verbindung zu HeLa-Zellen etablierten, wurde durch weitere Experimente unterlegt. Es wurden Infektionen von HeLa-Zellen durchgeführt und die EspA-Filamente der Bakterien anschließend mit einem EspA spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper mittels Immunogoldlabeling und anschließender elektronenmikroskopischer Analyse detektiert. Die anfänglichen Versuche, die EspA-Filamente von EHEC EDL933 auf diese Weise zu visualisieren, erwies sich als schwierig. Daher wurden intensive Analysen von Infektionen mit dem bedeutend besser sekretierenden Stamm STEC 413.89-1 auf HeLa-Zellen durchgeführt. Die Markierung von EspA aus STEC 413.89-1 erfolgte mit Hilfe des spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpers mAb B145 (Ebel et al. 1998). Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen, in denen die Bakterien nicht weiter markiert wurden, zeigten, dass EspA nicht zufällig über die bakterielle Oberfläche verteilt war, sondern sich in fädigen makromolekularen Strukturen entweder über das Bakterium oder auch vom Bakterium weg in den Raum entlangzog (s. Abb. 25A, C, D). Eine mit dem Goldgekoppelten sekundären anti-Maus-Antikörper, jedoch nicht mit mAb B145 markierte Negativkontrolle wies keine der beobachteten Filamente auf, so dass es sich um spezifisch gegen EspA markierte Ausläufer handelte (s. Abb. 25B). Mit mAb B145 und einem sekundären Antikörper Immunogold-markierte und mit 4% (w/v) wässrigem Uranyl Acetat negativ

kontrastierte Filamente zeigten bei höherer Auflösung, dass die EspA-Filamente von STEC 413.89-1 z.T. unregelmäßige fädige Strukturen waren (s. Abb. 25E, F, G).

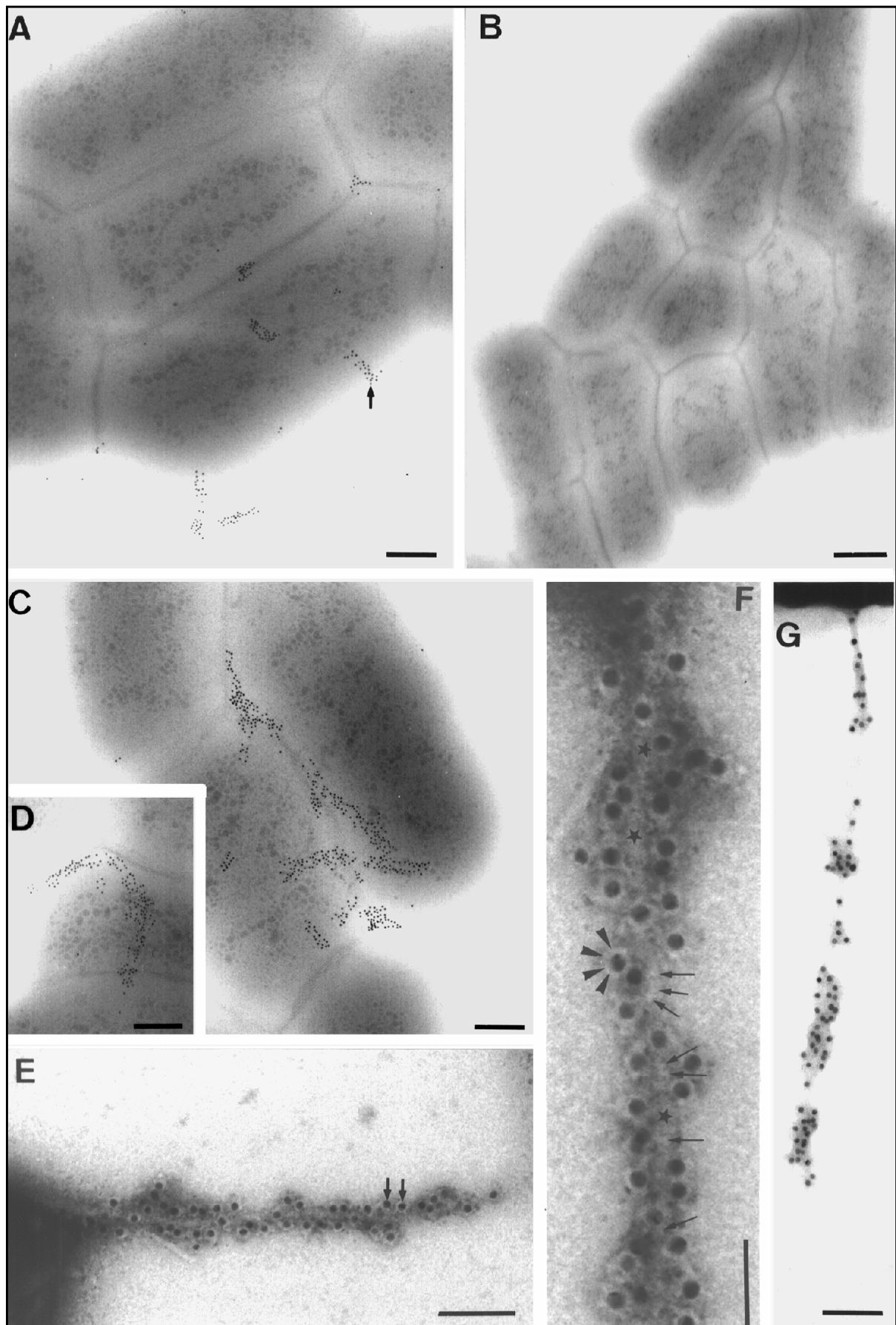


Abb. 25: Detektion von EspA enthaltenden makromolekularen Strukturen auf STEC 413.89-1 mit Hilfe der *on-grid*-Immunelektronenmikroskopie. An einen Kohlefilm angehaftete und auf Grids aufgezoogene Bakterien wurden mittels der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ohne weitere Kontrastierung untersucht (A, C und D). Unterschiedliche Mengen an EspA spezifischer Goldmarkierung konnten auf 1-5% der Bakterien (s. A und C) oftmals innerhalb hervorstehender Oberflächenstrukturen (Pfeile in A) beobachtet werden. In (D) ist ein Gold-markierter Verlauf entlang eines bakteriellen Poles zu erkennen. (B) Die Kontrolle ohne Verwendung des EspA spezifischen Antikörpers, jedoch mit Goldkomplex, weist keine der zuvor beobachteten Strukturen auf. Die Negativkontrastierung mit wässrigem Uranyl Acetat erlaubte eine verbesserte Auflösung der mit Goldpartikeln besetzten Filamente (E, F und G). In F wird eine Vergrößerung der in E durch Pfeile markierten Goldpartikel dargestellt; das filamentöse Gerüst, Antikörper bedeckte Goldpartikel und gebundene EspA-spezifische Antikörper sind durch Sterne, Pfeilköpfe bzw. ganze Pfeile hervorgehoben. Eine sehr schwache Negativkontrastierung offenbart lediglich die gebundenen Immunokomplexe, wohingegen die filamentöse Struktur nicht länger erkennbar ist (G). Balken repräsentieren 0,5 μm (B), 0,25 μm (A, C und D), 0,1 μm (E) und 50 nm (F).

Immun-Feldemissionsrasterelektronenmikroskopische (IFESEM) Analysen der Infektion von HeLa-Zellen mit STEC 413.89-1 bewiesen, dass auch STEC 413.89-1 EspA-Filamente bildeten, dass die EspA-Filamente sowohl auf den Bakterien lagerten (s. Pfeile in Abb. 26D), als auch von den Bakterien in die nächste Umgebung verliefen (s. Abb. 26C, E und F), dass die EspA-Filamente Bakterien miteinander verbanden (s. Pfeil in Abb. 26A und die Vergrößerung in Abb. 26C) und dass die EspA-Filamente eine Verbindung von den Bakterien zu den eukaryontischen Zellen etablierten (s. Abb. 26E). Etwa 10% der EspA-Filamente schienen aus mehreren gewundenen Strängen zu bestehen und waren dicker als einzelne Stränge (s. Abb. 26F und G). Die meisten Stränge waren jedoch dünn (s. Abb. 26J). Es wurden auch Bakterien beobachtet, die entfernt von HeLa-Zellen durch mehrere EspA-Filamente eine Verbindung zum Deckgläschen eingingen.

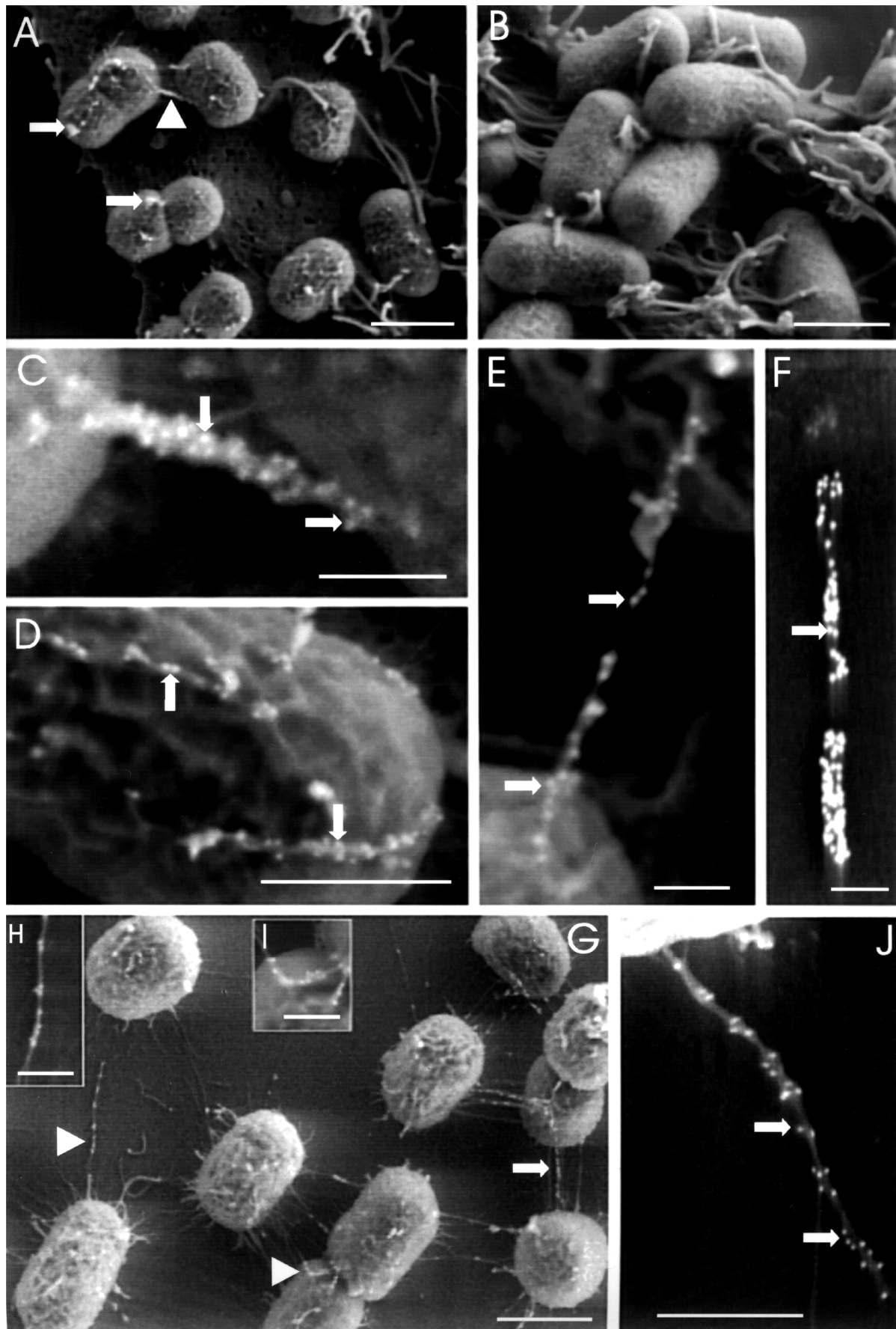


Abb. 26: Detektion von EspA-Filamenten auf STEC 413.89-1 mit Hilfe der IFEM. (A) Überblick von STEC 413.89-1 infizierten HeLa-Zellen. EspA ist als makromolekulare Struktur auf der Oberfläche der Bakterien (Pfeile) oder innerhalb filamentöser *surface appendages* (▲) sichtbar. Der Pfeilkopf indiziert ein Mikrovillus der Wirtszelle. (B) Eine parallel angeordnete Kontrolle ohne EspA-spezifischen Antikörper, jedoch mit Immungoldkomplex weist keine Goldmarkierung auf. (C) Die Vergrößerung des in (A) durch ein Dreieck markierten Filamentes dokumentiert die dichte Besetzung der Ausläufer mit EspA. (D) Makromolekulare Stränge mit EspA verlaufen entlang der bakteriellen Oberfläche. (E) EspA-Filamente verbinden zwei Bakterien miteinander. (F) Ein an einen Kohlefilm haftendes Bakterium wurde auf eine *grid* aufgezogen und direkt in der IFEM untersucht; Goldpartikel hellenein EspA enthaltendes Filament auf. (G) Während der Infektion an das Deckgläschen anhaftende Bakterien zeigten ebenfalls EspA-Filamente, die in den Raum (Vergrößerung H), auf der bakteriellen Oberfläche (Vergrößerung I) oder von Bakterium zu Bakterium (J) verliefen. Die in (G) durch Dreiecke gekennzeichneten Filamente entsprechen den Vergrößerungen (H), (I) und (J). Balken repräsentieren 1 µm (A, B und G), 0,5 µm (J), 0,2 µm (C und D) und 0,1 µm (E, F, H und I).

Für die EspA-spezifische Goldmarkierung HeLa-Zellen infizierender EHEC EDL933 blieb nach mehreren Infektionen die immunoelektronenmikroskopische Analyse wenig aussagekräftig. Dennoch ließ sich durch diese Methode der Nachweis erbringen, dass EHEC EDL933 ähnliche EspA-Filamente produziert wie STEC 413.89-1 (s. Abb. 27).

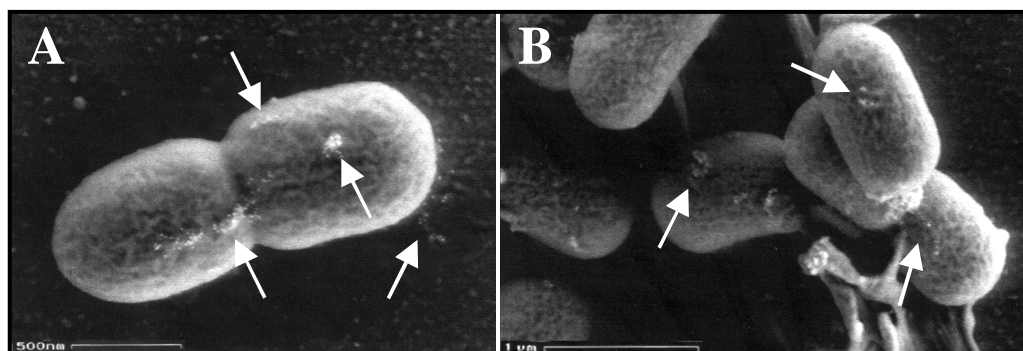


Abb. 27: Detektion von EspA-Filamenten auf EHEC EDL933 mit Hilfe der IFEM. (A) EspA ist als makromolekulare Struktur auf der Oberfläche von EHEC EDL933 sichtbar (Pfeile). (B) Die meisten adhärenen Bakterien weisen EspA-enthaltende *surface appendages* auf.

Die Analyse von EspA aus EHEC EDL933 und STEC 413.89-1 hatte ergeben, daß dieses Protein wie in EPEC über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleust wird (Ebel et al. 1996). Dagegenschindie Notwendigkeit dieses Faktors für den Pathogenitätsprozess signifikant höher zusein als für EPEC, da Deletionsmutanten in EHEC EDL933 sowie in STEC 413.89-1 (Ebel et al. 1998) neben dem Verlust der Fähigkeit zur Aktinakkumulation zum Verlust der Adhärenz an Epithelzellen führte. EspA wurde als Hauptbestandteil einer neuartigen Pilus-ähnlichen Oberflächenstruktur der Bakterien identifiziert, die interbakterielle und Bakterien-Zell-Kontakte etabliert. Somit stellt die über den Typ III Sekretionsmechanismus beobachtete Sekretion von EspA in das Medium wahrscheinlich ein Artefakt dar, wohingegen die Assimilation von EspA und möglicherweise anderen Komponenten zu EspA-Filamenten sicherlich die Situation *in vivo* widerspiegelt. EspA-Filamente könnten so als initiale Bindungsfaktoren und als putative Translokatorapparate für Effektorproteine fungieren.

5. Charakterisierung von EspD

In den Arbeiten mit EPEC und STEC war zunächst übersehen worden, dass in der SDS-PAGE von sekretierten Proteinen ein weiteres Protein eine ähnliche gelelektrophoretische Mobilität besaß wie EspB (Kenny und Finlay, 1995; Ebe et al. 1996). Dieses Protein wurde von Lai et al. als EspD bezeichnet und wird wie EspA und EspB über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleust (Lai et al. 1997). Die Studien an EspD aus EPEC lieferten allerdings keine Vorstellung über die Funktion dieses Proteins. Deutlich wurde nur, dass EspD in EPEC für die Ausprägung des A/E-Phänotyps und die Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors notwendig ist (Lai et al. 1997). Es sollte in dieser Arbeit neben der Bedeutung von EspD im Infektionsprozess von EHEC auch eine mögliche Funktion erarbeitet werden.

5.1. Sequenzanalyse von *espD*_{EDL933}

Die Lage von *espD*_{EDL933} innerhalb der IR_{EDL933}-Sequenz ist aus Abb. 13 zu sehen. EspD_{EDL933} weist 73,7% bzw. 73% Identität zu den Aminosäuresequenzen von EspD aus STEC 413.89-1 bzw. EPEC E2348/69 auf. Die Datenbank-Recherche eröffnete Homologien zu EspD aus anderen pathogenen *E. coli* sowie - im Gegensatz zu Untersuchungen von Lai et al. an EspD aus EPEC E2348/69 (Lai et al. 1997) - zu Proteinen anderer Bakterien (s. Tab. 15). Die Nukleotidsequenz *espD*_{EDL933} kodiert für 374 aa mit einem theoretischen Molekulargewicht von 39093 Da, einem pI-Wert von 5,23, und die Transmembranvorhersage ergab - entgegen den Befunden von Lai et al. bezüglich EspD_{EPEC} - drei putative und drei sichere membrandurchspannende Regionen (D_{7-S27}, T_{48-A68}, P_{108-S128}, I_{171-N191}, L_{194-M214}, V_{228-S248}). Die Wahrscheinlichkeit der Topologie innerhalb der bakteriellen inneren Membran beträgt P = 0,215, hingegen innerhalb von Eukaryonten in der Membran des endoplasmatischen Retikulums P = 0,850 und in der Plasmamembran P = 0,440. EspD_{EDL933} enthält *coiled-coil* Domänen von Y_{137-V172} (Ausschlussgrenze 0,5) und E_{332-M172} (Ausschlussgrenze 0,4) und gleicht so dem Homologon aus EPEC E2348/69 (V_{144-V178}, V_{326-S368}). EspD_{EDL933} enthält wie EspD_{EPEC} keine N-terminale Signalsequenz, und EspD wird über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleust (Lai et al. 1997).

5.2. Konstruktion einer *in-frame* Deletionsmutante von *espD*_{EDL933}

Die Konstruktion einer *in-frame* Deletionsmutante von *espD*_{EDL933} sollte die Bedeutung von EspD_{EDL933} für die Infektion von EHEC EDL933 an HeLa-Zellen aufdecken. Hierzu wurden zunächst durch k-PCR von EHEC EDL933 mit den Primer-Paaren ANKA288/ANKA289 bzw. ANKA290/ANK7191 zwei Fragmente amplifiziert, deren Amplifikationsprodukt aus einer OE-PCR mit den Primern ANKA288 und ANK7191 ein Deletionsprodukt von *espD*_{EDL933} (Δ *espD*_{EDL933}) ergab. Δ *espD*_{EDL933} enthielt die ersten 218 bp des 5'-Endes und die letzten 52 bp des 3'-Endes von *espD*_{EDL933} (s. Abb. 28), somit wurden 285 aa von EspD_{EDL933} deletiert. Durch Integration einer *Sma*I-Schnittstelle wurden 9 bp hinzugefügt. Δ *espD*_{EDL933} wurde in pCRII (pANK70) kloniert und durch Sequenzierung auf die Richtigkeit der Nukleotidsequenz sowie eines durchgängigen Leserahmens überprüft. Δ *espD*_{EDL933} wurde anschließend als *Kpn*I/*Xba*I-Fragment in pANK1 ligiert (pANK155) und in *E. coli* S17-1 (λ pir) transformiert. Transfer, Integration und Excision in EHEC EDL933 sowie die Kontrolle der Deletionsmutante erfolgten

analog zur Deletion von *EspA*_{EDL933} (4.2.) und mit Hilfe der Primer ANKA288/ANK7191 sowie der externen Primer ANK14/ANK16. Die *espD*_{EDL933}-Deletionsmutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ wies ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 636 bp für das Deletionsfragment enthaltende Chromosom auf (s. Abb. 28).

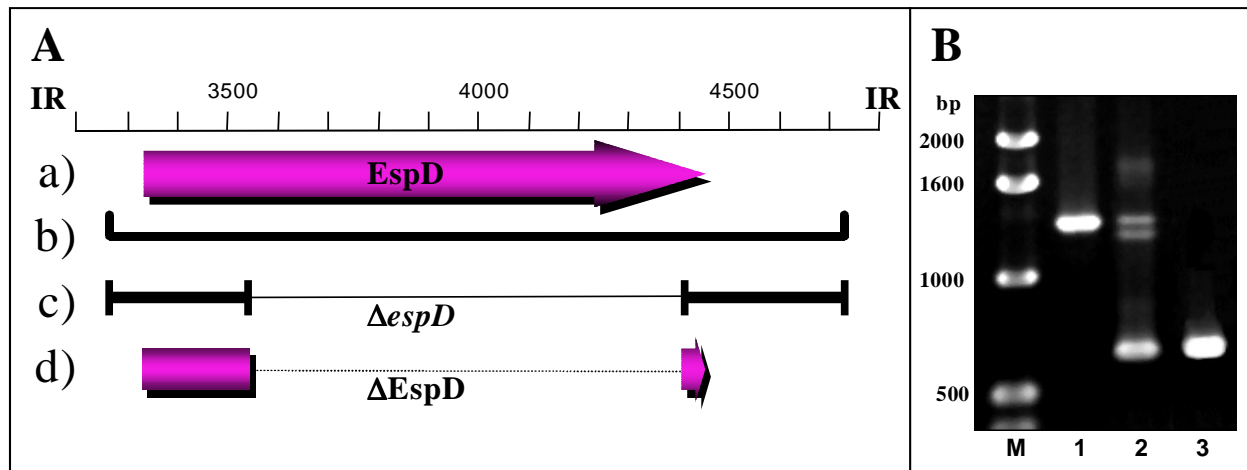


Abb. 28: Schematische Darstellung der Deletion von *espD*_{EDL933}. (A) Gestrichelte Linien im Schema zeigen deletierte Bereiche an. (a) Position von *espD* innerhalb der IR_{EDL933} und Größe des Translationsprodukts; (b) Position des aus den externen Primern ANK14 und ANK16 resultierenden PCR-Produkts des Wildtyps; (c) Position des aus den externen Primern ANKA288 und ANK7191 resultierenden PCR-Produkts von EHEC EDL933 $\Delta espD$; (d) Position des deletierten ORFs und Größe des Translationsprodukts. (B) Mit den Primern ANK 14 und ANK16 generierte PCR-Produkte: 1, Wildtyp EHEC EDL933; 2, Kointegrat EHEC EDL933::pANK155; 3, EHEC EDL933 $\Delta espD$.

Für die immunfluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Adhärenz der *espD*-Mutante von EHEC wurde auch eine Komplementationsmutante generiert, um polare Effekte des veränderten Bereichs auszuschließen. Hierzu wurde pANK84 in EHEC EDL933 $\Delta espD$ eingebracht, das den Sequenzbereich vom 5'-Ende des *eaeA*-Gens bis zum 3'-Ende des *espB*-Gens umfasste (s. Abb. 29). So konnte das *espD*_{EDL933}-Gen in dieser Komplementationsmutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ [pANK84] durch seinen natürlichen Promotor aktiviert werden. Ein Derivat von pANK84, das aus der unidirektionalen Verkürzung von pANK84 stammte und den gleichen Bereich, jedoch nicht das vollständige *espD*-Gen enthielt (pAKSK78), wurde als Kontrolle in EHEC EDL933 $\Delta espD$ eingebracht und so EHEC EDL933 $\Delta espD$ [pAKSK78] generiert, um auszuschließen, dass sich andere auf pANK84 lokalisierte Gene für die Komplementation verantwortlich zeichneten (s. Abb. 29).

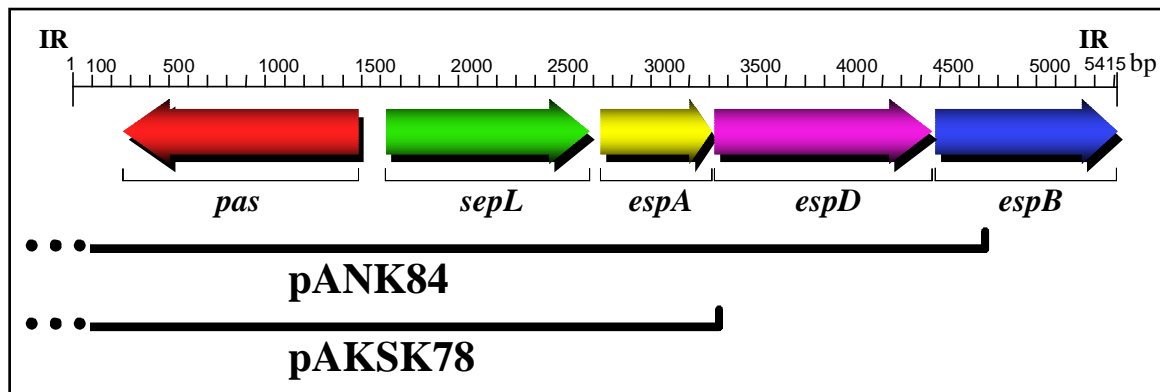


Abb. 29: Schematische Darstellung der Komplementation von EHEC EDL933 $\Delta espD$. Das Plasmid pANK84 enthielt eine Sequenz aus dem 3'-Ende von *eaeA* (angedeutet durch die unterbrochene Linie) bis zum 5'-Ende von *espB*. Das Plasmid pAKSK78 entstammte der unidirektionalen Verkürzung von pANK84 und enthielt ein Insert, das eine Sequenz aus dem 3'-Ende von *eaeA* (angedeutet durch die unterbrochene Linie) bis zum 5'-Ende von *espA* enthielt. Zur Orientierung der Positionen ist die ORF-Karte von IR EDL933 angezeigt (s. Abb. 13).

5.3. Analysesekretierter Proteine von EHEC EDL933 $\Delta espD$

Für die immunologischen Analysen von EspD EDL933 stand ein spezifischer monoklonaler Maus-Antikörper (mAb-anti-EspD) von Ebelet al. zur Verfügung. Die Produktion dieses Antikörpers basiert wie mAb B71 (s. 4.) auf sekretierten Proteinen von STEC 413.89-1.

Die Deletion in *espD* EDL933 sollte zu einer fehlenden Sekretion von EspD EDL933, nicht aber von EspA EDL933 oder EspB EDL933 führen. Um dies zu überprüfen, wurden die sekretierten Proteine der Mutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ einer Western Blot Analyse unterzogen. Es zeigte sich, dass EHEC EDL933 $\Delta espD$ kein EspD EDL933 sekretierte (s. Abb. 30B), und die Sekretion von EspA EDL933 und EspB EDL933 wurde durch die Deletion nicht erkennbar beeinträchtigt (s. Abb. 31). Da die *espD* EDL933-Mutante fraktioniert worden war, konnte auch die fehlende Expression von *espD* EDL933 nachgewiesen werden (s. Abb. 30B-E).

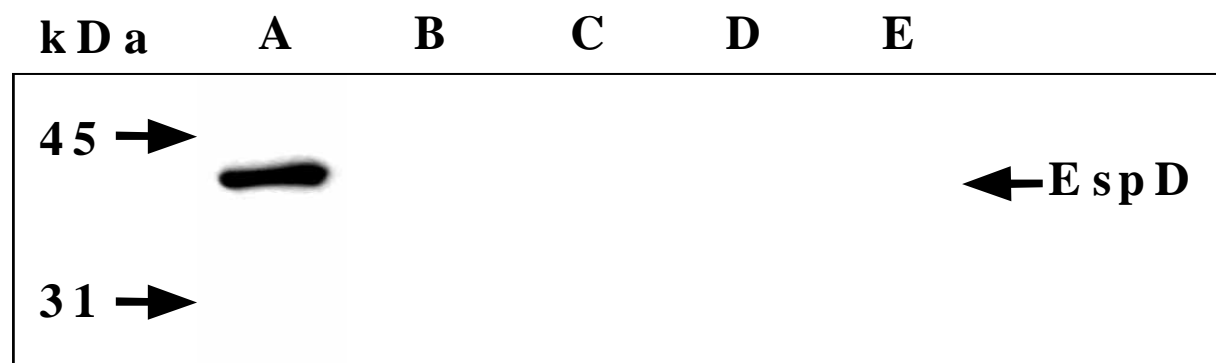


Abb. 30: Sekretions- und Expressionsmuster von EHEC EDL933 $\Delta espD$. Die Überstände 'aktivierter' Kulturen von EHEC EDL933 (A) bzw. der Deletionsmutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ (B) wurden TCA-gefällt und jeweils 30 μ g Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Entsprechend wurden jeweils 30 μ g der cytoplasmatischen Fraktion (C), der Fraktion der inneren Membran (D) und der äußeren Membran (E) aus einer Fraktionierung von EHEC EDL933 $\Delta espD$ aufgetragen. Die Detektion von EspD EDL933 erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers mAb-anti-EspD.

Für EPEC ist vermutet worden, dass eine Deletion in *espD* zu einer Verminderung der Sekretion von EspA und EspB führt, obgleich quantitative Analysen nicht durchgeführt wurden (Lai et al. 1997). Dies erinnert daran, dass die fehlende Expression mancher über das Typ III Sekretionssystem sekretierter Proteine die Sekretion anderer Zielproteine negativ beeinflusst (Collazo und Galán, 1996). Dagegen schien EHEC EDL933 $\Delta espD$ in der Expression und Sekretion von *espD*_{EDL933}, aber nicht erkennbar in der Sekretion von EspA und EspB beeinträchtigt zu sein, und es ist fraglich, ob die Beobachtungen in EPEC nicht beispielsweise auf eine instabilere mRNA destranskribierten *esp*-Operons zurückzuführen ist (s. 9.), da bereits die Expression der Esp-Proteine in der *espD*-Mutante vermindert zu sein scheint (s. Abb. 4 in Lai et al. 1997).

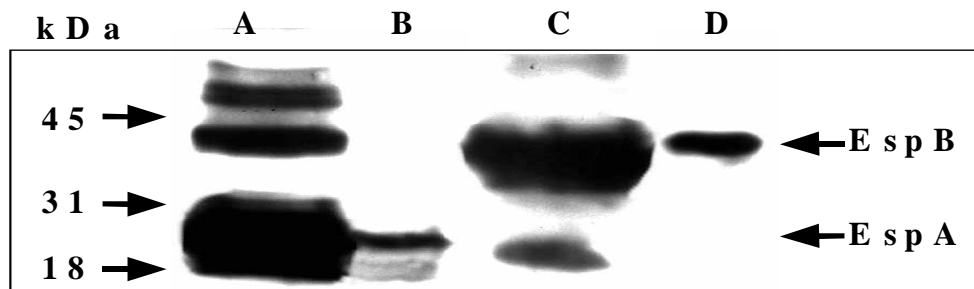


Abb. 31: Sekretion von EspA_{EDL933} und EspB_{EDL933} durch EHEC EDL933 $\Delta espD$. Der Überstand einer 'aktivierten' Kultur von EHEC EDL933 $\Delta espD$ (A und C) wurde TCA-gefällt und jeweils 30 µg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Entsprechend wurde jeweils 30 µg des Gesamtextraktes von EHEC EDL933 $\Delta espD$ aufgetragen (B und D). Die Detektion von EspA_{EDL933} (A und B) bzw. EspB_{EDL933} (C und D) erfolgte mit Hilfe der monoklonalen Antikörper B71 bzw. mAb-anti-EspD.

5.4. Adhärenz und Invasivität der $\Delta espD$ _{EDL933}-Mutante

Infektionsversuche von EHEC EDL933 $\Delta espD$ und Wildtyp-Stamm EHEC EDL933 wurden analog zu 4.4. durchgeführt. Die Plattierungsergebnisse ergaben, dass EHEC EDL933 $\Delta espD$ in der Adhärenz im Vergleich zum Wildtyp-Stamm erheblich beeinträchtigt war (s. Abb. 32). Dennoch waren einige Bakterien in der Lage, an HeLa-Zellen anzuhaften, wobei eine Waschstringenz nach Infektion gewählt wurde, die eine Unterscheidung zwischen schwacher Bindung der Bakterien an die HeLa-Zellen und unspezifischer Bindung (wie bei *E. coli* XL1Blue) erlaubte. Dieses Ergebnis scheint jedoch mit den Befunden von Knutton et al. übereinzustimmen, die für eine *espD*-Mutante aus EPEC E2348/69 eine zum Wildtyp-Stamm verminderte Adhärenz zu HeLa-Zellen beschrieben (Knutton et al. 1998).

Die Anzahl intrazellulärer Bakterien war trotz der um 1/8 geringeren Anzahl adhärenter Bakterien leicht höher als beim Wildtyp-Stamm, so dass das Fehlen von EspD_{EDL933} ähnlich wie bei der *espA*_{EDL933}-Deletionsmutante zu einem gesteigerten Verhältnis (8fach) von CFU intrazellulärer Bakterien/CFU adhärenter Bakterien führte.

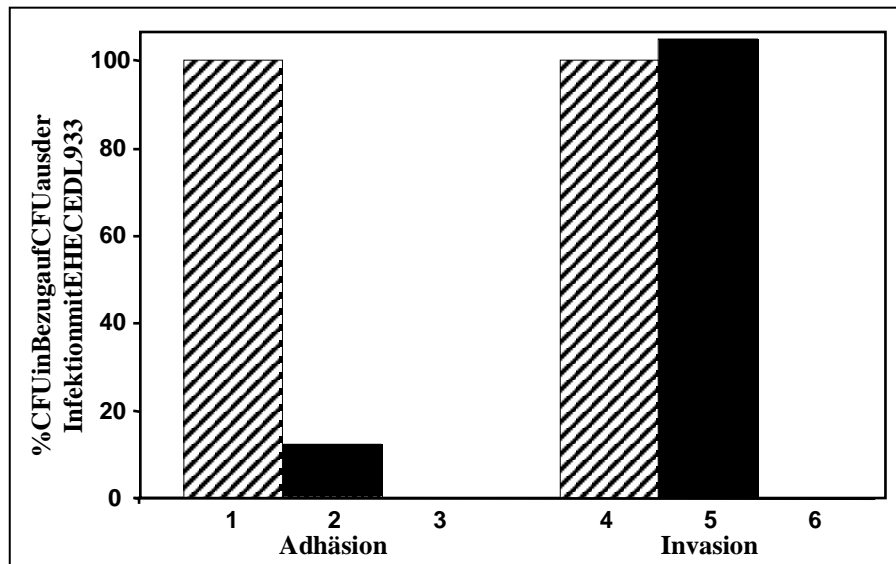


Abb. 32: Adhäsion und Invasion von EHEC EDL933 $\Delta espD$. Der Wildtyp EHEC EDL933 (1 und 4), und die *espD*_{EDL933}-Mutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ (2 und 5) wurden auf ihre Fähigkeiten, an HeLa-Zellen zu adhären (1-3) bzw. HeLa-Zellen zu invadieren (4-6), getestet wie in II.6.1. beschrieben. Als Negativkontrolle für den Invasionstest wurde *E. coli* XL1Blue (3 und 6) eingesetzt. Die Differenzen zwischen der *espD*_{EDL933}-Mutante und dem Wildtyp waren statistisch signifikant ($P \leq 0,05$).

Die verminderte Adhärenz der *espD*-Mutante aus EPEC wurde zwar beschrieben, allerdings nicht quantifiziert (Knutton et al. 1998). Es lässt sich jedoch aus den Studien an EPEC und EHEC schließen, dass EspD an der Adhäsion der Bakterien beteiligt ist. Eine im Vergleich zum Wildtyp-Stamm möglicherweise schwächere Bindung wird allerdings nicht signifikant durch die Deletion von *espD* verhindert, was darauf deuten könnte, dass Faktoren für die Initialbindung nicht vollständig blockiert sind.

5.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 $\Delta espD$

Da bei Infektionen mit EHEC EDL933 keine detektierbaren Tyrosin-Phosphorylierungen des Intimin-Rezeptors auftreten, wurde EHEC EDL933 $\Delta espD$ in der immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse zunächst auf die Fähigkeit zur Aktinakkumulation überprüft. Wie aus den quantitativen Versuchen bereits hervorgegangen war (s. 5.4.), standen weniger Bakterien in direktem Kontakt zu den HeLa-Zellen als im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 33). Auf HeLa-Zellen aufgelagerte EHEC EDL933 $\Delta espD$ wiesen keine erkennbare Aktinakkumulation auf (s. Pfeile in Abb. 33A). Dieses Ergebnis wird durch die Beschreibung der *espD*-Mutante aus EPEC E2348/69 gestützt, die nicht mehr Aktin akkumulieren oder eine Tyrosin-Phosphorylierung unterhalb adhärenter Bakterien initiieren konnte (Lai et al. 1997), allerdings weiterhin in der Lage war, an HeLa-Zellen zu adhären. Wie bereits bei der Deletion von *espA*_{EDL933} zeigte sich auch bei der Deletion von *espD*_{EDL933}, dass EHEC EDL933 in seiner Infektiosität eine bedeutende Abhängigkeit zu den untersuchten sekretierten Proteinen aufwies. Es dürfte sich hieraus schließen lassen, dass die enge Bindung von EHEC an die HeLa-Zellen von einem Zusammenspiel von mindestens EspA und EspD abhängt, wobei EspA zusätzlich zur engen Anhaftung auch für eine initiale Bindung notwendig zu sein scheint, EspD dagegen für die

Effizienz der Initialbindung und/oder für die enge, Intimin-vermittelte Bindung an die Wirtszelle. Hieraus könnte sich schließen lassen, dass die EspA-Filamente direkt oder indirekt die Initialbindung vermitteln und dass EspD entgegen den Vermutungen von Knutton et al. (Knutton et al. 1998) kein (essentieller) Bestandteil dieser Filamente ist, sondern lediglich am Aufbau der Filamente bzw. an der Signaltransduktion beteiligt ist. Vielmehr könnten die verkürzten EspA-Filamente der *espD*-Mutante von EPEC ein Resultat der schlechteren Sekretion von EspA sein. Dagegen ist zu vermuten, dass hinsichtlich der Initialbindung die EPEC/RDEC-Mutanten in dem Genlocus *espA* durch die Existenz weiterer effektiver Adhärenzfaktoren (z.B. die in EHEC fehlenden *bundle forming pili*) (Gunzburg et al. 1995) maskiert werden, so dass eine *espA*-Mutante von EPEC immer noch vermindert adhäsiv ist (Knutton et al. 1998). Dies wird auch dadurch weiter unterstützt, dass sehr stringentes Waschen dazu führte, dass zwar weiterhin adhärente Bakterien des Wildtypstammes auf HeLa-Zellen detektierbar waren, die $\Delta espD$ -Mutante dagegen vergleichbar zu $\Delta espA$ -Mutante überhaupt nicht mehr adhärte.

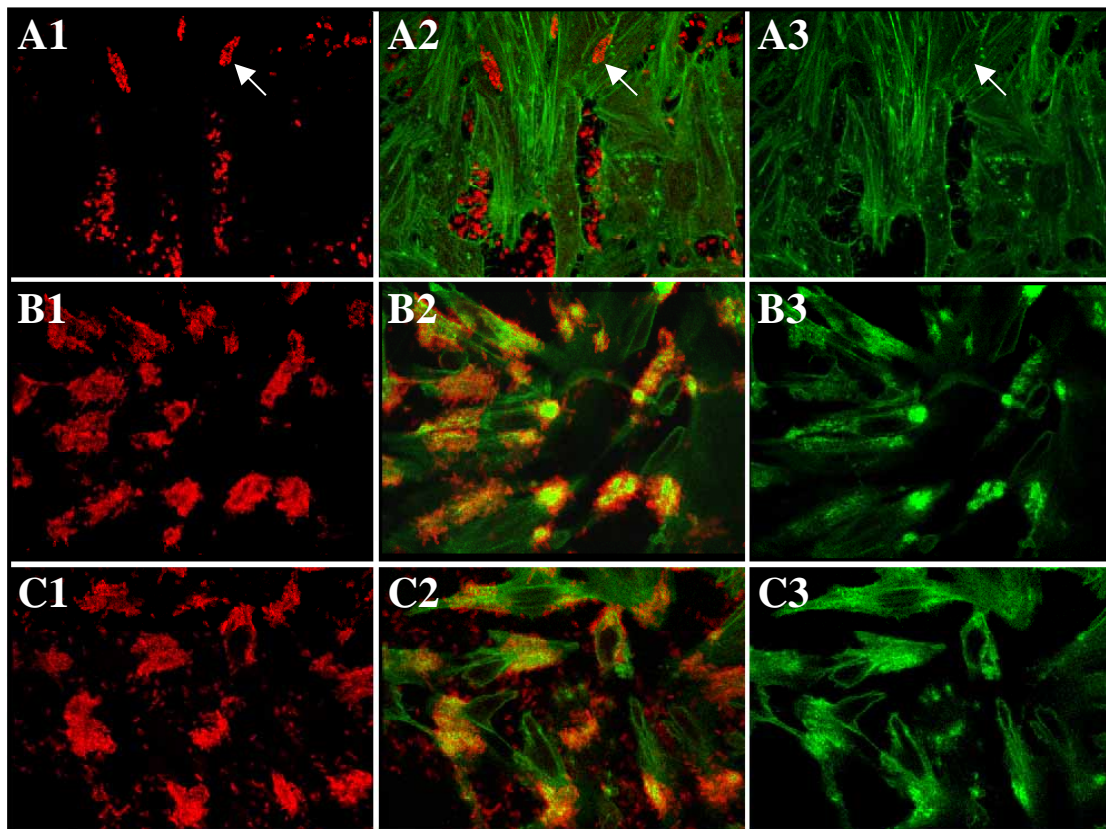


Abb. 33: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Adhärenz von EHEC EDL933 $\Delta espD$. HeLa-Zellen wurden mit der Deletionsmutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ (Reihe A), dem Wildtyp EHEC EDL933 (Reihe B) sowie mit der Komplementationsmutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ [pANK84] (Reihe C) infiziert. (1) Die Bakterien wurden mit TRITC-markierten Antikörpern, (3) F-Aktin mit FITC-markiertem Phalloidin gefärbt. (2) Overlay aus (1) und (3). (A) Die Analyse durch Immunfluoreszenzmikroskopie belegte, dass EHEC EDL933 $\Delta espD$ schlechter an die eukaryontischen Zellen anhaftete und keine Aktinakkumulation induzierte (s. Pfeile). (C) Die Komplementation der $\Delta espD$ -Mutante durch pANK84 führte zum gleichen Phänotyp wie der Wildtypstamm.

5.6. Analyse des Aggregationsverhaltens von EHEC EDL933 $\Delta espD$

Beider stehenden Anzucht über Nacht für Infektionsversuche war aufgefallen, dass sich EHEC EDL933 $\Delta espD$ am Boden des Gefäßes absetzte und ein beinahe klares Medium als Überstand hinterließ, während der Wildtyp-Stamm sowie alle anderen in dieser Arbeit konstruierten Mutanten ($\Delta espA$, Δpas , $\Delta sepL$) eine gewohnt trübe Kulturlösung boten (s. Abb. 33). Dennoch wuchs die Mutante nicht signifikant schlechter als der Wildtyp-Stamm, und die sedimentierten Bakterien waren mühelos resuspendierbar. Ein Mobilitätstest auf Softagar eröffnete, dass Kolonien von EHEC EDL933 $\Delta espD$ in der Fähigkeit, sich auf der Platte auszubreiten, nach einem Tag Inkubation bei 37°C um etwa 15% leicht eingeschränkt waren (nicht gezeigt), hingegen waren nach drei Tagen Inkubation die Koloniegrößen von Wildtyp und Deletionsmutante vergleichbar.

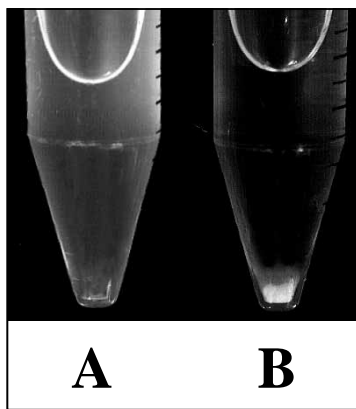


Abb. 34: Sedimentation von EHEC EDL933 $\Delta espD$. Der Wildtypstamm EHEC EDL933 (A) und die Deletionsmutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ (B) wurden über Nacht stehend bei 37°C in LB-Medium angezogen. Während der Wildtypstamm eine trübe Kulturlösung und kaum Sedimentation aufzeigte, wies EHEC EDL933 $\Delta espD$ eine klare Kulturlösung und ein leicht resuspendierbares Pellet auf.

Wurde EHEC EDL933 $\Delta espD$ dagegen über mehrere Tage in einem Kolben bei 37°C und 200 rpm angezogen, so verklumpten sich die Bakterien zu runden Pellets (s. offener Pfeil in Abb. 34) und es wurden große Proteinaggregate beobachtet (s. geschlossener Pfeil in Abb. 34), ähnlich wie sie für den Temperaturshift von 26°C auf 37°C bei *Yersinia* beschrieben worden sind (Michiels et al. 1990). Der Wildtypstamm EHEC EDL933 bildete, wenn überhaupt, nur sehr wenig Präzipitate und ein Temperaturshift wie bei *Yersinia* führte zu keiner Verstärkung des Effekts (nicht gezeigt).

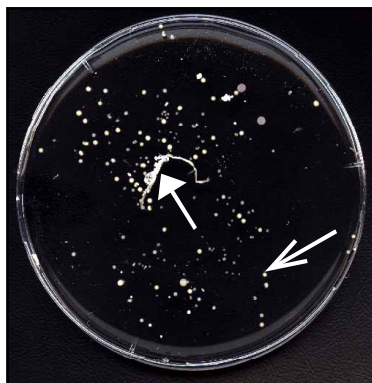


Abb. 35: Bildung eines Präzipitates durch EHEC EDL933 $\Delta espD$. EHEC EDL933 $\Delta espD$ wurde in DMEM mit 25 mM HEPES bei 37°C und 200 rpm für mehrere Tage angezogen. Der offene Pfeil indiziert beispielhaft eine runde Verklumpung von Bakterien, der geschlossene Pfeil hebt ein langgestrecktes Proteinpräzipitat hervor.

Die eingeschränkte Beweglichkeit könnte beispielsweise aus einer veränderten Regulation der Flagella-Synthese, wie dies für Mutanten von Typ III Sekretionssystemen anderer Mikroorganismen bereits beschrieben worden ist (Ochman et al. 1996), oder aus einer veränderten bakteriellen Oberfläche resultieren. Die rasterelektronenmikroskopische Analyse bestätigtenichtnurdasdurchdieErgebnisseaus5.4.und5.5.erwarteteBildeinerverminderten AdhärenzvonEHECEDL933 $\Delta espD$ anHeLa-Zellen(s.Abb.35),sonderneröffnetegleichzeitig eineErklärungsmöglichkeit,warumdieseMutanteinstehenderFlüssigkultur sedimentierte; die BakterienklumptenzuZellaggregatenvonmanchmalüber30Bakterienzusammen(s.Abb.37), wobei vielfach Material zwischen den Zellen (s. Pfeile in Abb. 37) daraufhindeutete, dass die BakteriendurchhöhermolekularesMaterialzusammengehaltenwurden.

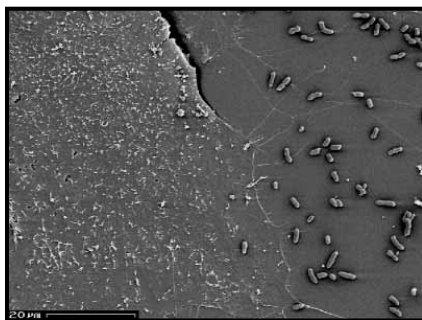


Abb.36: Infektion von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 $\Delta espD$. Die Infektion von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 $\Delta espD$ erfolgte über 6 h. Die rasterelektronenmikroskopische Analyse bestätigte die Befunde aus 5.5., dass die $espD_{EDL933}$ deletierte Mutante nicht an HeLa-Zellen adhärte.

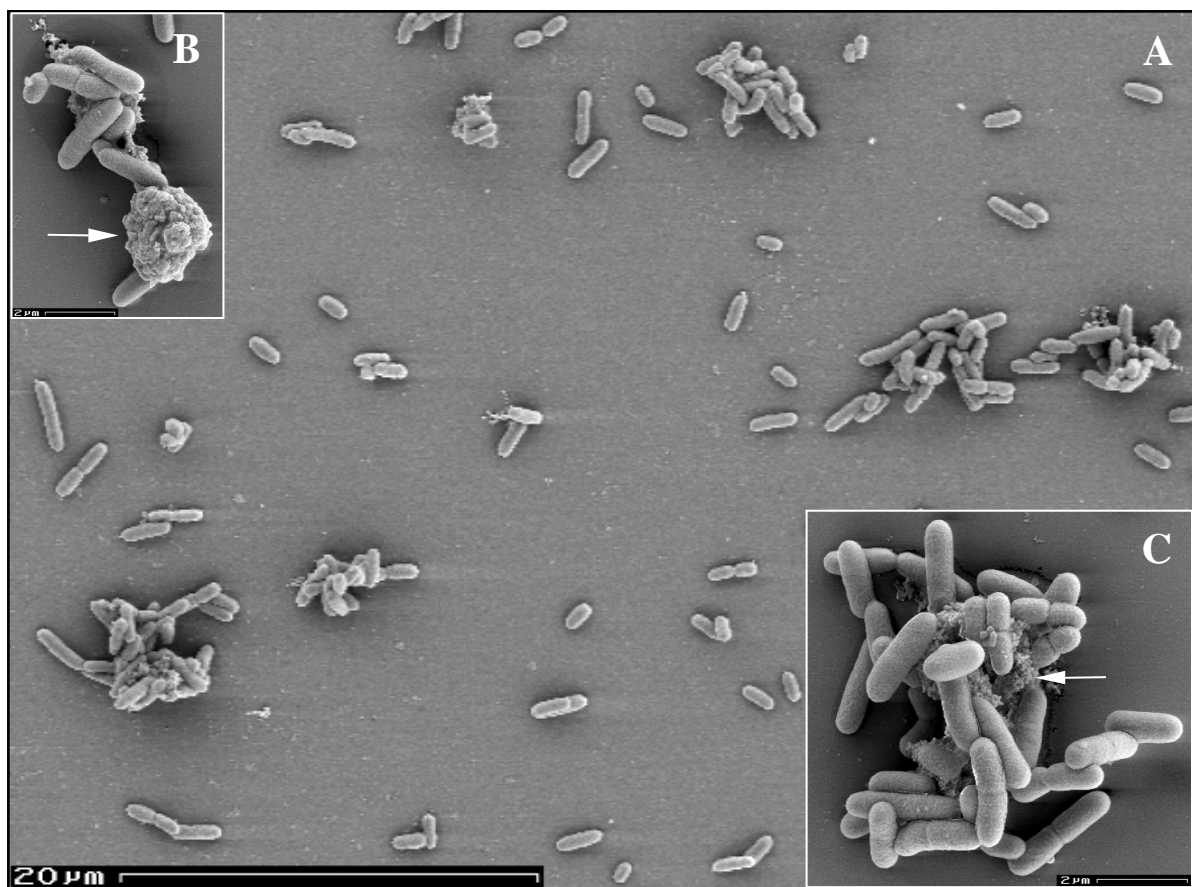


Abb.37: Bildung von Zellaggregaten von EHEC EDL933 $\Delta espD$. Während der Infektion von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 $\Delta espD$ wurde die Aggregation von Bakterien im Zellkulturmedium beobachtet (A). Die interbakterielle Adhäsion wird durch Material zwischen den Bakterien ausgelöst zu werden (Pfeile in B und C). Bisweilen wurden Zellaggregate von über 30 Bakterien registriert (C).

1998 haben Knutton et al. in ihren Untersuchungen an EspA aus EPEC die Hypothese aufgestellt, dass EspD möglicherweise für die Ausbildung der EspA-Filamente notwendig sein könnte, da eine *espD*-Mutante aus EPEC ihre Fähigkeit, EspA-Filamente zu produzieren, eingebüßt hatte (Knutton et al. 1998). Denkbar war im Falle von EHEC EDL933 $\Delta espD$, dass eine Sekretion von EspA_{EDL933} ohne einen koordinierten Aufbau der EspA-Filamente zur Verklumpung von EspA_{EDL933} und somit auch der Bakterien führte. Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen mit mAb B71 zeigten, dass EHEC EDL933 $\Delta espD$ nicht mehr in der Lage war, EspA-Filamente auszubilden (s. Abb. 38). Allerdings waren auf der Oberfläche einiger Bakterien sowie zwischen den Bakterien durch mAb B71 gefärbte Bereiche zu erkennen, die möglicherweise Ansammlungen von sekretierten EspA-Proteinen anzeigten, die nicht zu Filamenten aufgebaut waren (s. Pfeil in Abb. 38).

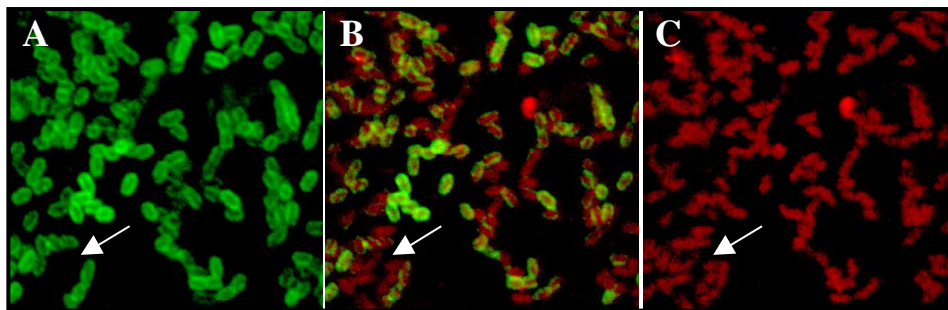


Abb. 38: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Bildung von EspA-Filamenten durch EHEC EDL933 $\Delta espD$. Gezeigt werden HeLa-Zellen nach 4 h Infektion mit EHEC EDL933 $\Delta espD$. Die Bakterien wurden mit AS-anti-O157 und FITC-gekoppeltem sekundären Antikörper (A und B) und EspA mit mAb B71 und TRITC-gekoppeltem Antikörper (B und C) markiert. Der Pfeil indiziert sekretiertes und aggregiertes EspA, das zwischen den Bakterien lokalisiert ist.

Zellaggregate von EHEC EDL933 $\Delta espD$ konnten auch auf HeLa-Zellen entdeckt werden (s. Abb. 39A). Allerdings wurde nicht beobachtet, dass die adhärenenten Bakterien von Mikrovilli umschlungen waren oder verstärkte die Bildung von Mikrovilli induzierten. Auch Bakterien, die sich offensichtlich im Zustand der Invasion befanden, zeigten nicht das typische *membrane ruffling* ähnliche Bild (s. Abb. 39B). Dagegen bildete die Komplementationsmutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ [pANK84] Mikrokolonien auf HeLa-Zellen, EHEC EDL933 $\Delta espD$ [pAKSK78] hingegen nicht.

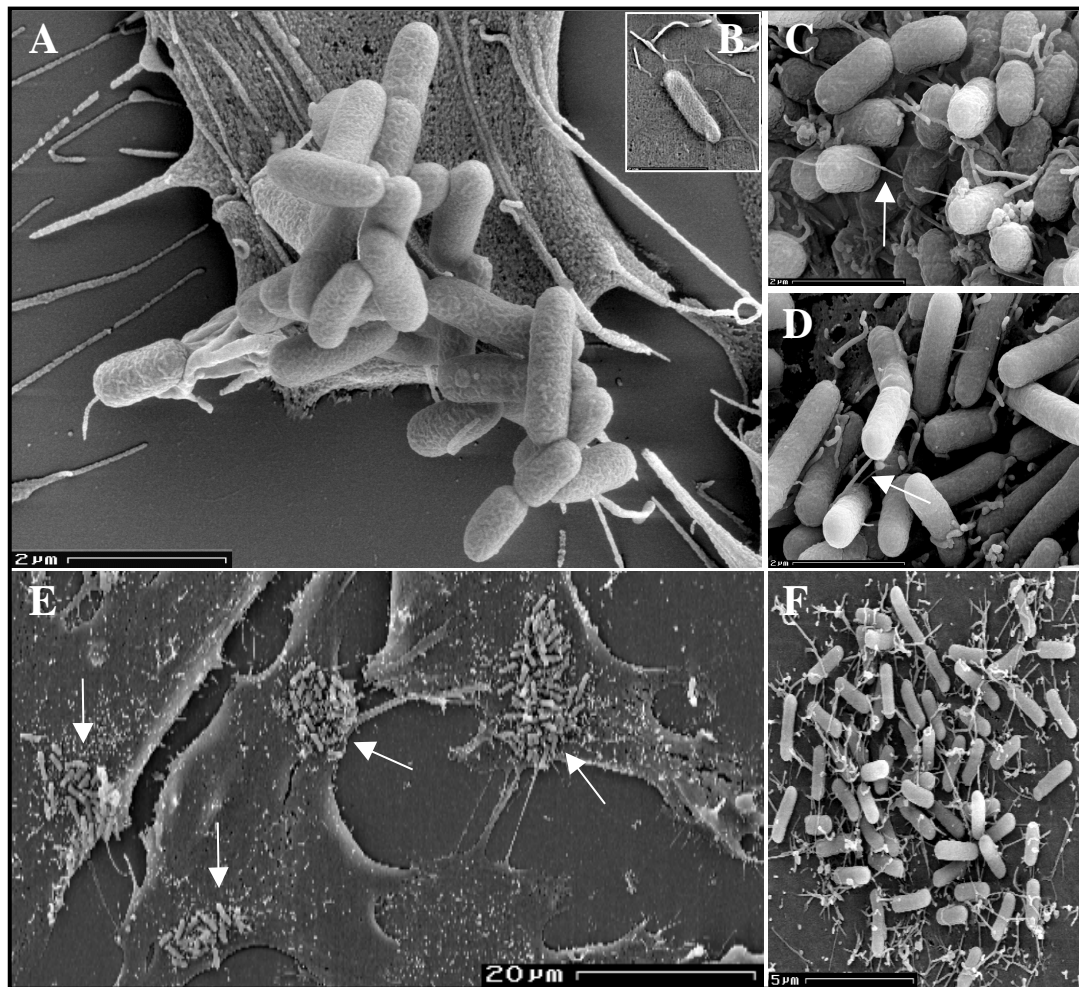


Abb. 39: Zellaggregate von EHECEDL933 $\Delta espD$ auf HeLa-Zellen. Bei der Infektion von HeLa-Zellen mit der *espD*_{EDL933}-Mutante von EHEC EDL933 wurden die Kammern nur schwach gespült, um zufällig anhaftende Bakterien in ihrer Position zu erhalten. (A) Es konnten Aggregate von Bakterien auf den eukaryontischen Zellen entdeckt werden, die jedoch keine Filamente ausbildeten. Die Bakterien waren im Gegensatz zum typischen Bild des Wildtypstamms EHEC EDL933 (s. Abb. 8) nicht von Mikro-illi umschlungen. (B) Dies galt auch für Bakterien, die scheinbar im Begriff der Invasion vorlagen. (C) Der Wildtypstamm EHEC EDL933 (D) bildete wie die Komplementationsmutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ [pANK84] Filamente aus (s. Pfeile in C und D). (E) Durch die Komplementationsmutante gebildete Mikrokolonien auf HeLa-Zellen werden durch Pfeile indiziert. (F) An HeLa-Zellen adhärierende EHECEDL933 $\Delta espD$ [pANK84] waren von Mikro- illiumschlungen.

Durch die Aufgabe von Makrophagen zur Phagocytose von Mikroorganismen kann man einen unmittelbaren Bakterien-Zell-Kontakt forcieren, auch wenn seitens der Bakterien keine Anlage zur Anhaftung an eukaryontische Zellen vorliegen sollte. Die Infektion der Makrophagen-Zelllinie J774-A1 mit STEC 413.89-1 führte zu einer übermäßigen Produktion von *surface appendages* (nicht gezeigt). In gleicher Weise durchgeführte Infektionen mit EHEC EDL933 dagegen zeigten leicht vermehrt morphologisch vergleichbare Filamente wie bei der Infektion von HeLa-Zellen (nicht gezeigt). Wurden J774-A1-Zellen mit EHECEDL933 $\Delta espD$ infiziert, so konnten in der rasterelektronenmikroskopischen Analyse keine Filamente entdeckt werden (s. Abb. 40A und B). Einige Bakterien zeigten jedoch auf ihrer Oberfläche die in Abb. 39 beschriebenen Aggregate (s. Abb. 40C). Es muss allerdings vermerkt werden, dass die verwendete Zelllinie im Fc-Rezeptor defekt war, so dass keine Aussagen über Antiphagocytose

getroffen werden können. Die Adhäsion der *espD*-Mutante an J774-A1-Zellen könnte möglicherweise über die Integrine stattfinden, da eine Translokation des Intimin-Rezeptors wegen des Fehlens von EspA-Filamenten ausgeschlossen werden dürfte.

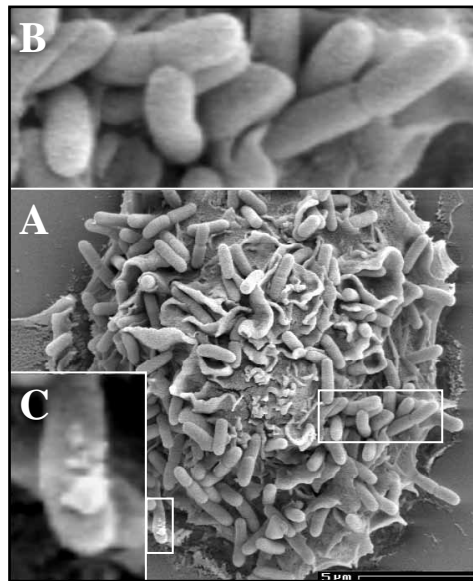


Abb. 40: Infektion von J774-A1 mit EHEC EDL933 $\Delta espD$. Die Infektion der J774-A1-Zellen erfolgte wie für HeLa-Zellen beschrieben. Nach 5 h Infektion wurden die Zellen gewaschen, mit 3,7% (w/v) *p*-Formaldehyd fixiert und auf Grids aufgezogen. (A) Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigt die starke Belagerung der eukaryontischen Zellen mit EHEC EDL933 $\Delta espD$. Die Bakterien wiesen jedoch keine Filamente auf (Vergrößerung B) oder zeigten strukturlose Aggregate auf der bakteriellen Oberfläche (Vergrößerung C).

5.7. Lokalisation von EspD_{EDL933} während der Infektion von EHEC EDL933 an HeLa-Zellen.

Knutton et al. stellten 1998 die Hypothese auf, dass EspD wie EspA eine Funktion innerhalb der EspA-Filamente ausführen könnte, weil eine *espD*-Mutante aus EPEC nur geringe Mengen an EspA sekretierte und kaum detektierbare Filamente produzierte (Knutton et al. 1998). Anfängliche Bemühungen im Rahmen von immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen EspD aus EHEC EDL933 zu detektieren schlugen fehl. Erst die Anwendung des konfokalen Lasermikroskops erbrachte eine genügende Auflösung und Differenzierungsmöglichkeit. EspD_{EDL933} konnte so unterhalb adhärenter Bakterien beobachtet werden (s. Abb. 41A). Die Analyse der vertikal-optischen Ebene (x,z Sektionen) erbrachte den direkten Nachweis der Lokalisation von EspD_{EDL933} (s. Abb. 41B).

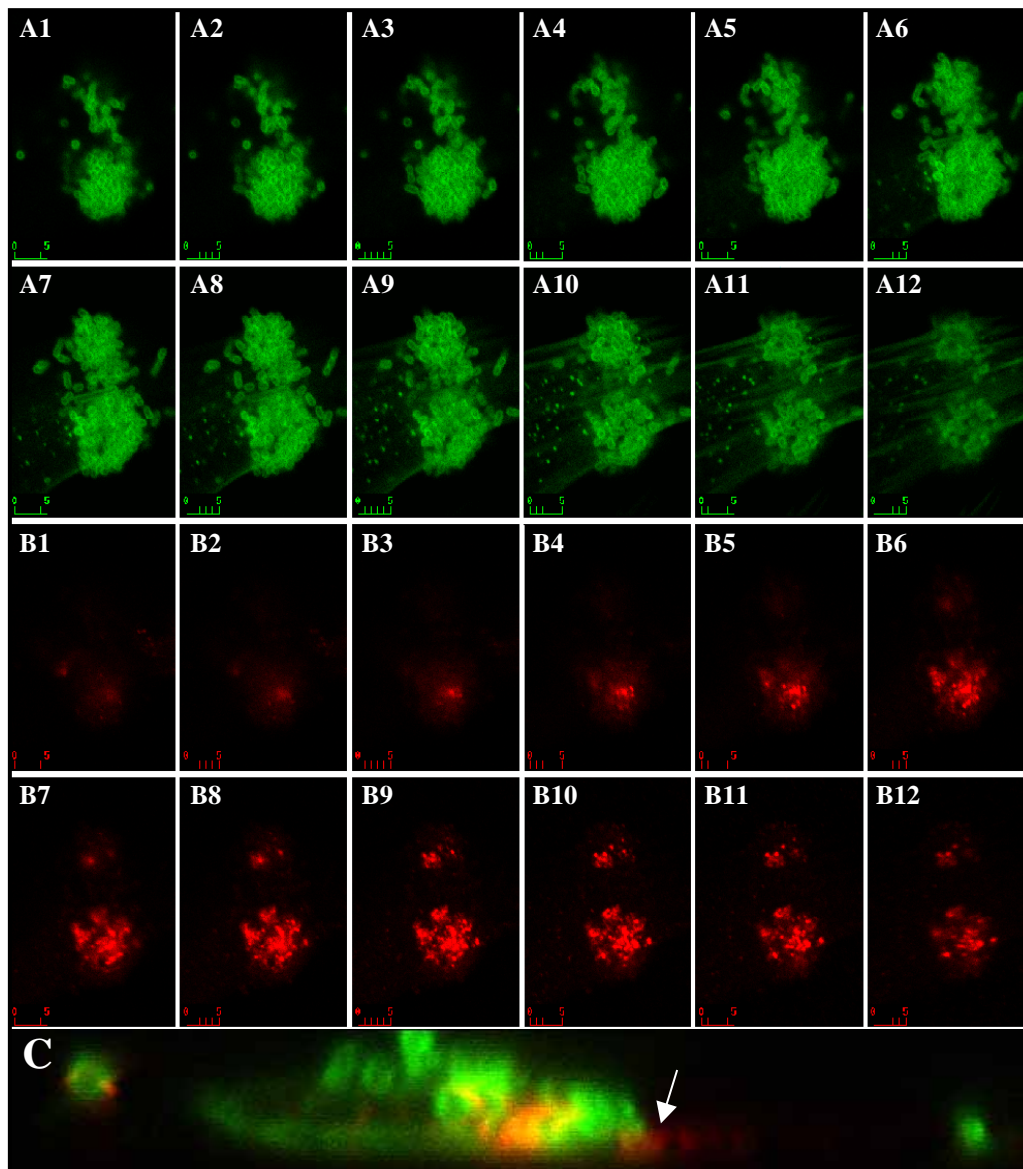


Abb.41: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von EspD_{EDL933} während einer Infektion von EHEC EDL933 an HeLa-Zellen. Gezeigt werden HeLa-Zellen nach 4h Infektion mit EHEC EDL933. Die Bakterien wurden mit AS-anti-O157 und FITC-gekoppeltem sekundären Antikörper (Reihe A), das Aktin der eukaryontischen Zellen mit FITC-gekoppeltem Phalloidin (Reihe A) und EspD mit mAb-anti-EspD und TRITC-gekoppeltem sekundären Antikörper (Reihe B) markiert. Die analytische Sektionierung mit Hilfe des konfokalen Laserelektronenmikroskopes erfolgte in 0,02 μm -Abständen. (C) Die x,z-Sektionierung verdeutlicht bei gleicher Markierung die Lokalisation von EspD_{EDL933} unterhalb der adhärenenten Bakterien. Der Pfeil indiziert EspD_{EDL933}, das in der Membran der Wirtszelle lokalisiert ist.

Mit der Detektierbarkeit von EspD_{EDL933} an HeLa-Zellen, und nicht wie in Veröffentlichungen zuvor als freigesekretiertes Protein vermutet, und der Homologie zu YopB, einem über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleusten Translokatorprotein, stellte sich die Frage, ob EspD_{EDL933} die Funktion eines Translokators innehaben könnte. In *Yersinia* inserieren die Proteine YopB und YopD in die Cytoplasmamembran der Wirtszelle und bilden gemeinsam eine Pore für die gerichtete Injektion von Effektorproteinen in die eukaryontische Zelle. Ein ähnliches System wäre für die beiden aus EPEC und EHEC sekretierten Proteine EspB und EspD denkbar. Für EspB aus EPEC wurde bereits die Rolle eines Translokators innerhalb der Cytoplasmamembran

durch Fraktionierung von HeLa-Zellen sowie Untersuchungen mit Hilfe eines Cya'-EspB-Reportersystems nachgewiesen (Wolff et al. 1998). Die Funktion von EspD wurde bislang noch nicht charakterisiert.

Ø9cm-Petrischalen mit HeLa-Zellen wurden mit 'aktivierten' EHEC EDL933 bzw. mit EHEC EDL933 $\Delta espD$ für 6h infiziert. Die parallel in 24-well Platten angesetzte Infektionsreihe wurde für die immunfluoreszenzmikroskopische Detektion von EspD_{EDL933} (s. Abb. 41) und gleichzeitig als Kontrolle für die Infektionseffizienz verwendet. Nach Infektion wurden die Bakterien und HeLa-Zellen, wie in II.7.3. beschrieben, fraktioniert in sekretierte bakterielle Proteine im Zellkulturmedium, Cytosol der HeLa-Zellen, Cytoplasmamembran der HeLa-Zellen und eine Fraktion, die Nuklei, cytoskeletale Proteine und Proteine adhärenter Bakterien beinhaltet. Wegen der geringen Menge an detektierbarem EspD_{EDL933} wurden $\frac{3}{4}$ der erhaltenen Fraktionen vor der Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Methanol-Fällung aufkonzentriert (s. II.7.5.) und vollständig eingesetzt. Als Kontrollen dienten die aus dem Kulturüberstand 'aktivierter' EHEC EDL933 bzw. EHEC EDL933 $\Delta espD$ gewonnenen sekretierten Proteine (s. II.7.4.). Mittels Western Blot Analyse und mAb-anti-EspD konnte die Topologie von EspD_{EDL933} während der Infektion von EHEC EDL933 an HeLa-Zellen innerhalb der Cytoplasmamembran bestimmt werden (s. Abb. 42D). Geringere Mengen von EspD_{EDL933} fanden sich im Zellkulturmedium (s. Abb. 42B), was auf eine effektive gerichtete Insertion in die Cytoplasmamembran hinweist, sowie im Cytosol der HeLa-Zellen (s. Abb. 42C). Die hier gefundene Lokalisation impliziert die Vergleichbarkeit mit der Topologie von EspB aus EPEC während der Infektion. Das Ausbleiben eines EspD spezifischen Signals für die Fraktion mit Nuklei, cytoskeletale Proteine und Proteine adhärenter Bakterien deutet darauf hin, dass EspD_{EDL933} nicht mit den Wirtsproteinen des Cytoskelets interagiert. In dieser Fraktion befinden sich allerdings auch die cytoplasmatischen Proteine adhärenter Bakterien. EspD_{EDL933} wurde hier nicht detektiert, weil die Anzahl adhärenter Bakterien eine nicht suffiziente Proteinmenge zur Detektion in der Western Blot Analyse enthielt. Die Analyse 'aktivierter' Bakterien hatte gezeigt, dass EspD_{EDL933} effektiv sekretiert wird und nur eine geringe Menge im bakteriellen Cytoplasma nachweisbar bleibt oder aber im Cytoplasma im Vergleich zu EspA_{EDL933} und EspB_{EDL933} relativ instabil ist (nicht gezeigt).

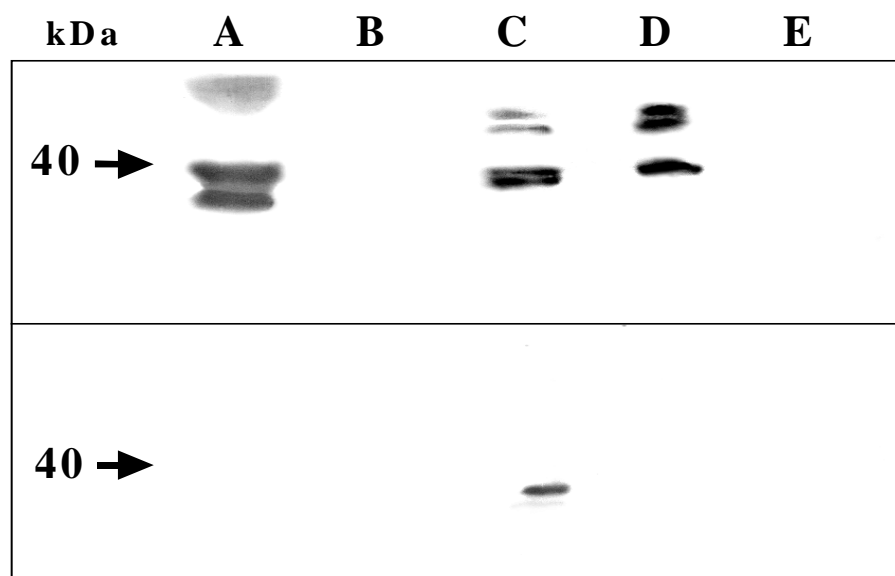


Abb. 42: Fraktionierung infizierter HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden in Ø 9 cm-Petrischalen mit EHEC EDL933(1) bzw. EHECEDL933 $\Delta espD$ (2) für 6 h infiziert. Der komplette Inhalt der Infektionsschale wurde fraktioniert und $\frac{3}{4}$ davon einer Western Blot Analyse mit Hilfe von mAb-anti-EspD unterzogen. Als Kontrollendientendiese sekretierten Proteine (A, jeweils 30 µg) aus 'aktivierten' Kulturen von EHECEDL933 und EHEC EDL933 $\Delta espD$. (B) sekretierte Proteine im Zellkulturmedium der Infektion, (C) TCA-gefällte Cytosol-Fraktion der HeLa-Zellen, (D) Cytoplasma-Fraktion der HeLa-Zellen, (E) Fraktion mit Nuklei und cytoskeletalen Proteinen der Wirtszellen sowie Proteinen adhärenter Bakterien.

Deletionsmutanten in *espD* führten sowohl in EPEC (Lai et al. 1997) als auch in EHECEDL933 zu einer Reduzierung der Adhärenz an eukaryontische Zellen. Die Analysen von EspD zeigten weiterhin, dass dieses über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleuste Protein für die Signaltransduktion in Epithelzellen, die zur Aktinakkumulation führt, notwendig ist. Die Funktion von EspD könnte in Analogie zum homologen YopB aus *Yersinia* in der Translokation von Effektorproteinen, die z.B. für die Reorganisation des Cytoskelets notwendig sind, in die Wirtszelle sein, da EspD in der Cytoplasmamembran der Wirtszellen nachgewiesen wurde. Hingegen scheint EspD zwar für den Aufbau von EspA-Filamenten mitverantwortlich zu sein, ist selbst jedoch kein Bestandteil dieses putativen Translokatorapparates.

6. Charakterisierung von SepL

Die up- und downstream von *sepL*_{EDL933} liegenden Gene tragen in EHECEDL933 entscheidend zur Virulenz des Organismus bei, und daher war zu vermuten, dass *sepL*_{EDL933} ebenfalls eine wichtige Rolle in der Infektiosität von EHECEDL933 spielt. Primäre Untersuchungen sollten nach Hinweisen durch die Sequenzanalyse sowie durch eine *in-frame* Deletionsmutante von *sepL*_{EDL933} erfolgen.

6.1. Sequenzanalyse von *sepL*_{EDL933}

*sepL*_{EDL933} ist das erste downstream von *eaeA* in gleicher Orientierung gelegene Gen. Die Entfernung des Startcodons zum upstream und in entgegengesetzter Richtung kodierten, monocistronischen *pas*_{EDL933} (s. 7.) beträgt 143 bp. Gleichzeitig liegt *sepL*_{EDL933} unmittelbar upstream vom kodierenden Bereich der sekretierten Proteine EspA_{EDL933}, EspD_{EDL933} und EspB_{EDL933} und ist von *espA*_{EDL933} durch nur 58 bp getrennt. Dennoch gehört *sepL*_{EDL933} nicht der gleichen Operator-Einheit an (s. 9.), so dass es wahrscheinlich eine singuläre Transkriptionseinheit etabliert. Seine 1055 bp kodieren für eine Aminosäuresequenz von 351 aa mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 39 952 Da und einem pI von 4,7. Auffällig ist, dass SepL_{EDL933} mit 15,1% einen sehr hohen Anteil an Leucin und mit 11,4% einen sehr hohen Serin-Anteil enthält. SepL_{EDL933} zeigte in der Analyse durch PSORT keine N-terminale Signalsequenz und wurde des Weiteren als ein, wenn auch mit geringer Wahrscheinlichkeit (P = 0,102), putatives Protein der bakteriellen inneren Membran vorhergesagt, wenngleich mit Hilfe des Algorithmus TMPred keine transmembranen Domänen beschrieben werden konnten. Die Topologie der äußeren Membran sowie des Peri- oder Cytoplasmas wurde als unwahrscheinlich (P = 0,000) oder ungeklärt beschrieben. Der direkte Vergleich der Aminosäuresequenzen von *sepL* aus EHECEDL933 und STEC413.89-1 mittels des GAP Algorithmus ergab eine Identität

von 93,7% und eine Similarität von 96%, der Aminosäuresequenzen von EHEC EDL933 und EPEC E2348/6994,3% Identität und 96,9% Similarität (s. Abb. 43).

1	MANGIEFNQNPASVFNSNSLDFELESQQLTQKNSSNISSP	SepL 933
1	MANGIEFNQNTASVFNSNSLDFELESQPLTQKNSSNSYSP	SepL 413
1	MANGIEFNQNPASVFNSNSLDFELESQQLTQKNSSNTSSP	SepL EPEC
41	LINLQNELAMITSSSSLSETIEGLSLGYRKGSARKEEEEGST	SepL 933
41	LNLQNELAMITSSSSLSETIEGLSLGYRKGSARKEEEEGTT	SepL 413
41	LINLQNELAMITSSSSLSETIEGLSLGYRKGSARKEEEEGTT	SepL EPEC
81	IEKLLNDMQELLTLTDSDKIKELSLKNSGLLEQHDPTLAM	SepL 933
81	TEKLLNDMQELLTLTDSDKLKEELSLKNSGLLEQHDPLNLA	SepL 413
81	IEKLLNEMQELLTLTDSDKIKELSLKNSGLLEQHDPTLAM	SepL EPEC
121	FGNMPKGEIVALISSLLQSKFVKIELKKKYARLLLDLLGE	SepL 933
121	FGNMPKGEIVALISSLLQSKFVKIELKKKYAKLLLDLLGE	SepL 413
121	FGNMPKGEIVALISSLLQSKFVKIELKKKYAKLLLDLLGE	SepL EPEC
161	DDWELALLSWLGVGELNQEGIQKIKKLYEKAKDEDESENGA	SepL 933
161	DDWELALLSWLGVGELNQEGIQKIKKLYEKAKDEDESEKGA	SepL 413
161	DDWELALLSWLGVGELNQEGIQKIKKLYEKAKDEDESENGA	SepL EPEC
201	SLLDWFMEIKDLPEREKHLKVIIRALSFDSL SYMSSFEDKV	SepL 933
201	SLLDWFMEIKDLPEREKHLKVIIRALSFDSL SYMSSFEDKV	SepL 413
201	SLLDWFMEIKDLPEREKHLKVIIRALSFDSL SYMSSFEDKV	SepL EPEC
241	KTSSSIISDLCRV IIFLSLDNYADIIISISIKKDKDIILNEV	SepL 933
241	KTSSSIISDLCRV IIFLSLDNYTDIIAISIN KDKDVILNEV	SepL 413
241	RTSSSIISDLCR I IIFLSLNNYTDIIAISISIKKDKDVILNEM	SepL EPEC
281	LSIIIEHVWLTEDWLLLESPSRVSI VEDKH IY YFHLLK DFF T	SepL 933
281	LSIIIEHVWLTEDWLLLESPSRVSI VEDKHV Y YFHLLK DFF A	SepL 413
281	LSIIIEHVWLTEDWLLLESPSRVSI VEDKHV Y YFHLLK E FFA	SepL EPEC
321	SLPDACFIDS EQR ENALLMIGKVIDYKEEII	SepL 933
321	SLPDACFIDREQR DNTLLMIGKVIDYKEDVI	SepL 413
321	SLPDACFIDNEQRS NNTLLMIGKVIDYKEDVM	SepL EPEC

Abb. 43: Konservierung von SepL in pathogenen *E. coli*. Das Alignment von SepL_{EDL933} (SepL 933) mit SepL aus STEC 413.89-1 (SepL 413) und SepL aus EPEC E2348/69 (SepL EPEC) zeigt deutlich die starke Konservierung dieses Proteins im LEE verschiedener pathogener *E. coli*.

Die Homologiesuche mit SepL_{EDL933} in den Datenbanken mittels des BLASTP + BEAUTY Algorithmus (Worley et al. 1995; Altschul et al. 1990) erzielte für SsaL aus *Salmonella typhimurium* (SsaL_{Stym}) die größte Homologie (24,3% Identität bzw. 35% Similarität). Die Funktion dieses Proteins aus *Salmonella* ist bislang nicht beschrieben worden. SsaL_{Stym} beinhaltet 338 aa mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 38900 Da und einem pI-Wert von 4,7. Der direkte Vergleich der Ergebnisse aus den Sequenzanalysen der Aminosäuresequenzen SepL_{EDL933} und SsaL_{Stym} eröffnete trotz der mäßigen Homologien der beiden Aminosäuresequenzen die Konservierung struktureller Eigenschaften beider Proteine. Beide Sequenzen weisen mit einem Sequenzfenster von 21 aa *coiled-coil* Regionen im N-Terminus auf (s. Abb. 43C), allerdings ist dies nicht als möglicher Hinweis auf die Multimerisierung der Proteine zu sehen, da die Vorhersage mit einem Sequenzfenster von 28 aa keine *coiled-coil* Struktur indiziert. Neben allgemeinen Befunden wie dem Fehlen von Ladungs-Clustern oder ungeladenen Segmenten sowie transmembranen Segmenten zeigen die

Aminosäuresequenzen SepL_{EDL933} und SsaL_{Stym} einen hydrophilen N-Terminus und einen hydrophoben C-Terminus, einen großen prozentualen Anteil an Helices (64,2% bzw. 64,6%) sowie große Anteile an Leucin (15,1% bzw. 16%). Beide Aminosäuresequenzen weisen im N-terminalen Bereich ein Helix-Loop-Helix-Motiv (HLHM) auf (s. Abb. 43B): in SepL_{EDL933} sehr ausgeprägt von S₁₉ bis L₅₆ (38aa) und weniger stark in SsaL_{Stym} von A₅₄ bis L₉₁ (38aa). SsaL_{Stym} enthält zudem ein ausgeprägtes HLHM im C-terminalen Bereich von N₂₉₇ bis N₃₃₄ (38aa). Das HLHM wurde für viele eukaryontische Regulatoren beschrieben (Murre et al. 1989a; Davis et al. 1987; Braun et al. 1989; Benezra et al. 1990) und scheint in der Dimerisierung der Proteine eine Rolle zu spielen; unmittelbar im Anschluss an das HLHM befindet sich der eigentliche DNA-bindende Bereich, der sich durch eine N-terminal gelegene basische α -Helix auszeichnet. Eine solche Helix konnte für SepL_{EDL933} nicht bestimmt werden. Obgleich für die Schleife (Loop) des im N-Terminus gefundenen Bereiches ein Knick (Turn) vorhergesagt wurde, handelt es sich dennoch nicht um ein Helix-Turn-Helix-Motiv (HTHM), da die Anzahl von drei Aminosäuren zwischen den Helices in einem klassischen HTHM mit zwölf in SepL_{EDL933} überschritten wird (Harrison und Aggarwal, 1990). Nebeneinem HTHM im N-terminalen Bereich findet sich in der LysR-Familie der Regulatorproteine (Schell, 1993; Henikoff et al. 1988) ein konserviertes Motiv:

[NQKRHSTAG][LIVMFYTA]_{xx}[STAGLV][STAG]_{xxxx}[LIVMYCTQR][PSTANLVER]_x[PSTAGQV][PSTAGNVMF][LIVMF]_{xx}[LIVMF]_{xx}[LIVMF]_{xx}[RKEAV]_{xx}[LIVMFYNTAE]_{xxx}[LIMVT] (Henikoff und Henikoff, 1994).

Die Sequenzanalyse von SepL_{EDL933} ergab, dass in dem LysR-Motiv homologe Domäne im C-Terminus vorlag, bei der vier (in der SepL_{EPEC}-Sequenz fünf) Reste vom Konsensus abwichen (s. Abb. 43). Weiterhin wurde in der Aminosäuresequenz von SepL_{EDL933} von L₂₁₂ bis M₂₃₃ ein degeneriertes Leucin-Zipper Motiv (Lx₆Lx₆Lx₆M) entdeckt (s. 43D). Das Leucin-Zipper Motiv (LZM) wurde als DNA-Bindungsdomäne beschrieben, welches für die Dimerisierung DNA-bindender Proteine sowohl in homo- als auch in heterodimerer Form verantwortlich ist, und nicht zwingend nur Leucin beinhalten muss, sondern auch andere hydrophobe Aminosäuren wie z.B. Methionin sind ebenfalls zulässig für ein solches Motiv (Landschulz et al. 1988; Alberts et al. 1997). SsaL_{Stym} weist ein kurzes LZM von L₂₃₀ bis L₂₄₄ auf, das nur drei Leucine enthält (Lx₆Lx₆L). N-terminal vom LZM finden sich in SepL_{EDL933} zwei Bereiche hoher positiver Teilladungen, die mögliche Kandidaten der eigentlichen DNA-Bindung darstellen: K₁₄₀K₁₄₃K₁₄₇K₁₄₈K₁₄₉R₁₅₂ und K₁₈₃K₁₈₅K₁₈₆K₁₉₀K₁₉₂. Die erste dieser Domänen zeigte in der Motivsuche von SepL_{EDL933} mit Hilfe des Blocks Algorithmus eine signifikante Übereinstimmung mit dem KRY-Motiv der DNA Polymerase Familie B (BL00116E), welches für die DNA-Bindung dieser Protein-Familie verantwortlich ist (s. 43A). SepL_{EDL933} weist hierin drei, SsaL_{Stym} im analogen Sequenzbereich fünf positiv geladene Reste auf.

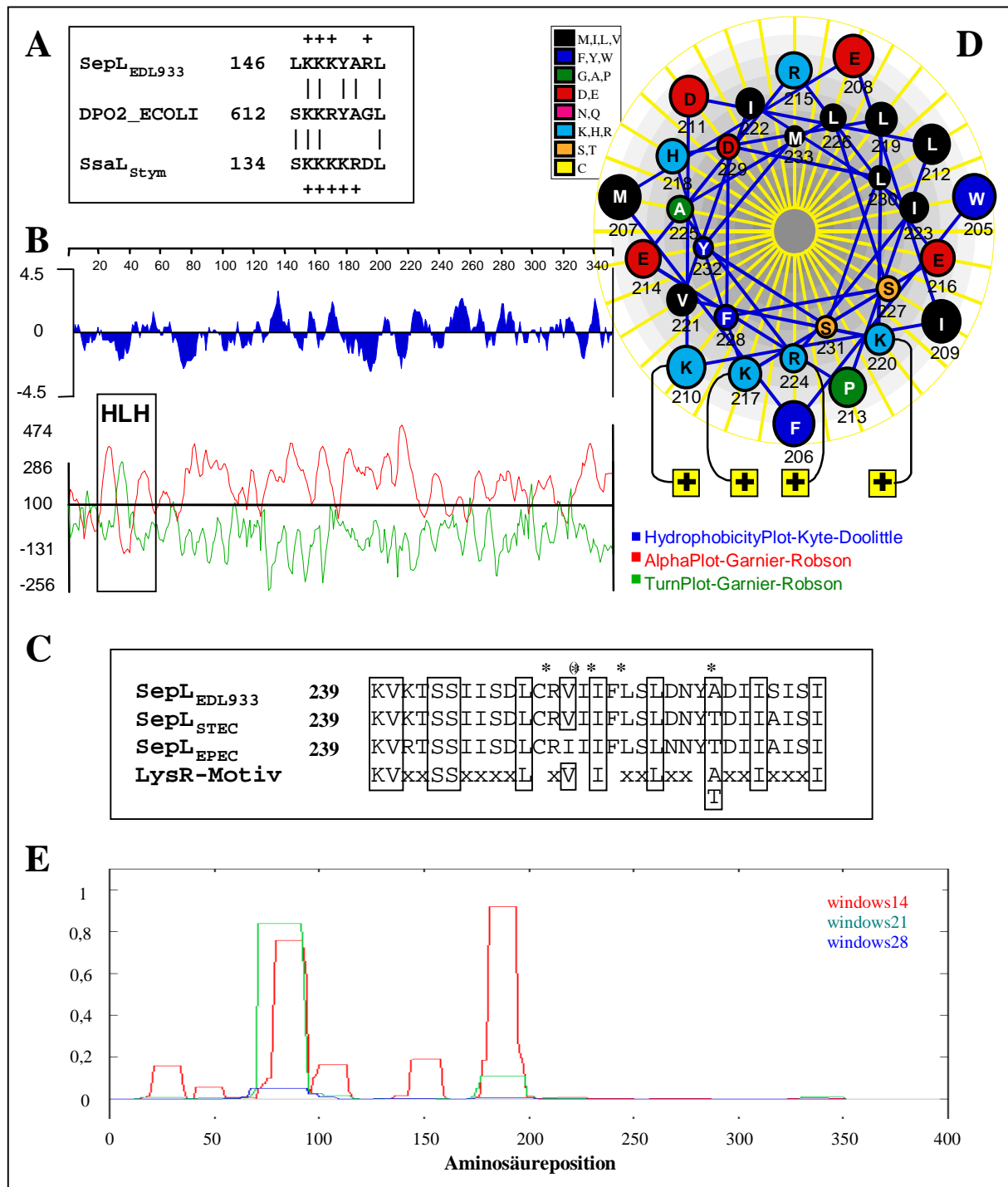


Abb. 44: Computeranalytische Daten von SepL_{EDL933} (A) SepL_{EDL933} und das homologe Protein SsaL_{Stym} enthalten im mittleren Bereich ihrer Aminosäuresequenz eine Domäne, die homolog zum KRY-Motiv der DNA-Polymerase 2 aus *E. coli* (DPO2_ECOLI) der DNA Polymerase Familie B (BL00116E) ist. Kreuze geben positiv geladene Aminosäuren an. (B) Die Gegenüberstellung der Vorhersagen für α -Helices und Coil-Bereiche für SepL_{EDL933} mittels des Programms DNASTar und des Garnier-Robson Algorithmus ergab die Detektion eines Helix-Loop-Helix (HLH) Motives im N-terminalen Bereich. (C) Alignment von SepL aus EHEC_{EDL933} (SepL_{EDL933}), STEC 413.89-1 (SepL_{STEC}) und EPEC E2348/69 (SepL_{EPEC}) mit korrespondierenden Aminosäureresten aus dem Motiv für die LysR-Familie (LysR). Nicht-konservierte Reste innerhalb des Motivs sind als x dargestellt, Abweichungen vom Konsensus werden oberhalb des Alignments mit * gekennzeichnet. (D) Helical-Wheel von SepL_{EDL933} (W₂₀₅-M₂₃₃). Man beachte die Organisation des LZMs auf einer Seite, positiv geladener Reste (hervorgehoben durch Pluszeichen) auf der

gegenüberliegenden Seite des Helical Wheels. (E) Die *coiled-coil*-Bereiche von SepL_{EDL933} beschränken sich auf Sequenzfenster mit 21 aa Länge.

6.2. Konstruktion einer *in-frame* Deletionsmutante von *sepL*_{EDL933}

Der Nachweis der Relevanz von SepL_{EDL933} während der Infektion von EHEC EDL933 an eukaryontischen Zellen sollte durch die Herstellung einer *in-frame* Deletion in *sepL*_{EDL933} und anschließender Analyse der Mutante erfolgen. Es wurden zunächst mittels k-PCR von EHEC EDL933 mit den Primer-Paaren ANKA291/ANKA292 bzw. ANKA293/ANKA294 zwei Fragmente amplifiziert, deren Amplifikationsprodukt aus einer OE-PCR mit den Primern ANKA291 und ANKA294 ein Deletionsprodukt von *sepL*_{EDL933} (Δ *sepL*_{EDL933}) ergab. Δ *sepL*_{EDL933} enthielt die ersten 255 bp des 5'-Endes und die letzten 72 bp des 3'-Endes von *sepL*_{EDL933} (s. Abb. 45). Somit wurden 243 aa von *sepL*_{EDL933} deletiert. Durch die Insertion einer *Bam*HI-Schnittstelle und die Wahl des für die OE-PCR überlappenden Bereiches wurden 108 aa von SepL_{EDL933} und zusätzliche 3 aa zwischen N-Terminus und C-Terminus erhalten. Δ *sepL*_{EDL933} wurde in pCR2.1 (pANK117) kloniert und durch Sequenzierung auf die Richtigkeit der Nukleotidsequenz sowie eines durchgängigen Leserahmens überprüft. Δ *sepL*_{EDL933} wurde anschließend als *Kpn*I/*Xba*I-Fragment in pANK1 ligiert (pANK157) und in *E. coli* S17-1 (λ pir) transformiert. Transfer, Integration und Excision in EHEC EDL933 sowie Kontrolle der Deletionsmutante erfolgten analog zur Deletion von EspA_{EDL933} (4.2.) und mit Hilfe der externen Primer ANK22/ANK9952. Die *sepL*_{EDL933}-Deletionsmutante EHEC EDL933 Δ *sepL* wies ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 1054 bp für das Deletionsfragment enthaltende Chromosom auf (s. Abb. 45).

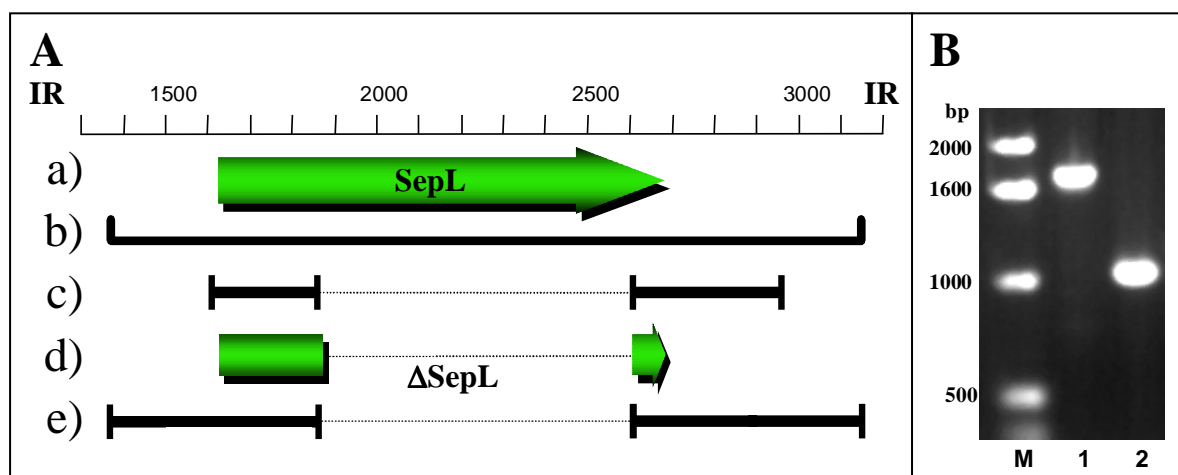


Abb. 45: Schematische Darstellung der Deletion von *sepL*_{EDL933}. Gestrichelte Linien im Schema zeigen deletierte Bereiche an. Die im Schema dargestellten PCR-Produkte sind entsprechend ihrer Nummerierung im Gelfoto links aufgeführt: 1, Wildtyp EHEC EDL933; 2, EHEC EDL933 Δ *sepL*. (a) Position von *sepL* innerhalb der IR_{EDL933}. (b) Position des aus den externen Primern ANK22 und ANK9952 resultierenden PCR-Produkts des Wildtyps. (c) Position der aus den Deletionsprimern resultierenden Deletionsfragmente und (d) deletierter ORF. (e) Position des aus den externen Primern ANK22 und ANK9952 resultierenden PCR-Produkts von EHEC EDL933 Δ *sepL*.

Die Δ *sepL*-Mutante wurde durch ein Plasmid *in trans* komplementiert, das aus der unidirektionalen Verkürzung von pANK84 entstanden war (s. 3.2.) und das komplette Gen

*sepL*_{EDL933}, den natürlichen Promotorbereich, sowie *pas* und Fragmente von *eaeA* und *espA* enthielt (s. Abb. 46).

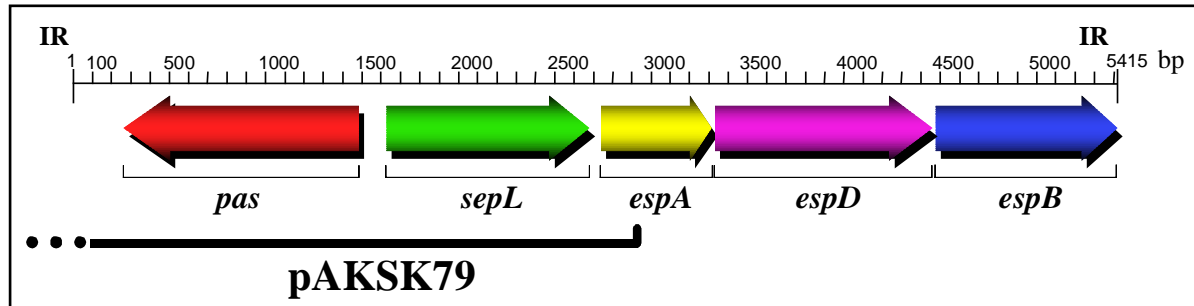


Abb. 46: Schematische Darstellung der Komplementation von EHEC EDL933 $\Delta sepL$. Das Plasmid pAKSK79 entstammt der unidirektionalen Verkürzung von pANK84 und enthielt ein Insert, das eine Sequenz aus dem 3'-Ende von *eaeA* (angedeutet durch die unterbrochene Linie) bis zum 5'-Ende von *espA* enthielt. Zur Orientierung der Position ist die ORF-Karte von IR_{EDL933} angezeigt (s. Abb. 13).

6.3. Analyse sekretierter Proteine von EDL933 $\Delta sepL$

Die Auswirkungen einer Deletion in *sepL*_{EDL933} zeigten sich bereits an Hand der Untersuchung bakteriellen Kulturüberstandes und cytoplasmatischer Fraktionen. Western Blot Analysen ergaben, dass EspA_{EDL933}, EspD_{EDL933} und EspB_{EDL933} in geringeren Mengen als beim Wildtyp exprimiert und sekretiert wurden (vergl. Abb. 47 A und B).

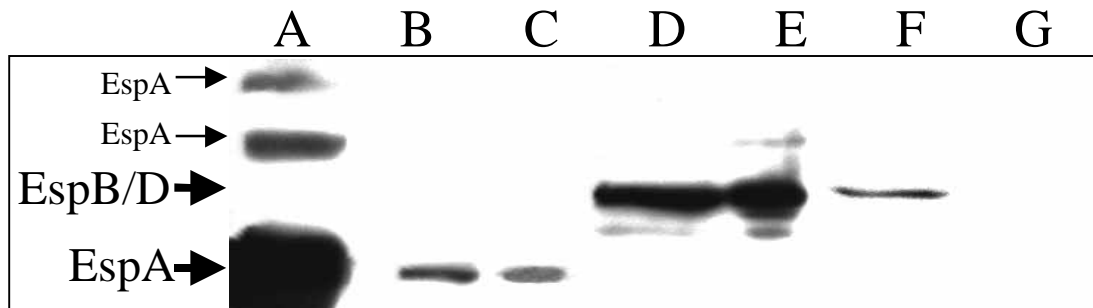


Abb. 47: Sekretions- und Expressionsmuster von EHEC EDL933 $\Delta sepL$. Die Überstände 'aktivierter' Kulturen von EHEC EDL933 (A) bzw. der Deletionsmutante EHEC EDL933 $\Delta sepL$ (B, D und F) wurden TCA-gefällt und jeweils 30 µg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Entsprechend wurden jeweils 30 µg Gesamtextrakt aus EHEC EDL933 $\Delta sepL$ in den Spuren C, E und G aufgetragen. Die Detektion der Proteine EspA_{EDL933} (A, B und C), EspB_{EDL933} (D und E) und EspD_{EDL933} (F und G) erfolgte mit Hilfe der in Tab. 9 angegebenen monoklonalen Antikörper. Die Position der Esp-Proteine ist durch Pfeile angezeigt, in Spur A sind darüber hinaus Multimere von EspA durch kleine Pfeile indiziert.

In Coomassie gefärbten SDS-Gele zeigte sich, dass die Deletionsmutante in stark verringertem Maße EspA_{EDL933}, EspD_{EDL933} und EspB_{EDL933} sekretierte. Die Sekretion eines über 100 kDa großen Proteins, wahrscheinlich PssA (EspP), war nicht beeinträchtigt (s. Abb. 48). Hingegen sekretierte EHEC EDL933 $\Delta sepL$ ein Protein mit einem zugeordneten Molekulargewicht von etwa 54 kDa (P54_{EDL933}) in den Überstand. Die Sekretion dieses Proteins durch die Deletionsmutante konnte durch die Verfügbarkeit von *sepL* *intrans* wieder aufgehoben werden.

(s. Abb. 48C). Stattdessen wurden die Proteine des stärkeremMaßesekretiert.

esp-Operons (s. 9.) sowie EspE in etwas

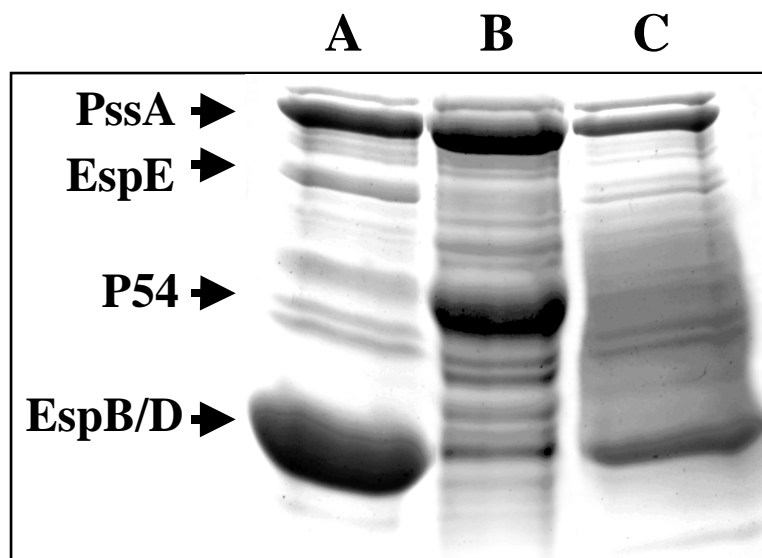


Abb. 48: Sekretion von P54_{EDL933} durch EHEC EDL933 Δ *sepL*. Coomassie-Färbung TCA-gefällter Überstände aus 'aktivierten' Kulturen von (A) EHEC EDL933, (B) EHEC EDL933 Δ *sepL* und (C) EHEC EDL933 Δ *sepL* [pAKSK79] (B) Die Deletionsmutante sekretiert ein unbekanntes Protein mit einer elektrophoretischen Mobilität von 54 kDa. (C) Diese Sekretion wurde durch die Komplementation mit pAKSK79 aufgehoben. Die Positionen der Esp-Proteine werden durch Pfeile markiert.

Ein sekretiertes Protein der Größe 55/54 kDa (P55_{STEC}) war bereits in Kulturüberständen von STEC 413.89-1 entdeckt worden, wo es verstärkt bei 20°C statt 37°C sekretiert wurde (Ebel et al. 1996). In späteren Untersuchungen hatte sich ergeben, dass P55_{STEC} Homologien zu einem Flagellin-Protein aus *E. coli* aufwies (pers. Mitteilung Ebel). Zur Analyse von P54_{EDL933} wurden diese sekretierten Proteine von EHEC EDL933 Δ *sepL* mit TCA aus dem Kulturüberstand gefällt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet, kurz mit Ponceau-Rot gefärbt, und dann wurde die Bande der Laufhöhe von etwa 54 kDa ausgeschnitten. Die Bestimmung des N-Terminus erfolgte in der Abteilung für Strukturforschung der GBF, Braunschweig. Die N-terminale Sequenzierung von P54_{EDL933} führte zur Bestimmung der ersten 20 Aminosäuren (s. Abb. 49). Es konnte keine Übereinstimmung mit dem veröffentlichten N-Terminus von P55_{STEC} gefunden werden. Datenbank-Recherchen ergaben ebenfalls keine signifikanten Homologien zu veröffentlichten Proteinen. Da auch TBLASTN-Recherchen unternommen wurden, ist davon auszugehen, dass das Gen für P54_{EDL933} weder im LEE (acc. no. AF071034) noch auf dem Megaplasmid pO157 (acc. no. Y09824) lokalisiert ist. Dennoch deutet die sehr starke Sekretion und der gleichzeitige Erhalt des Methionins darauf hin, dass P54_{EDL933} durch ein effizientes Transportsystem sekretiert, aber nicht prozessiert wird, wie dies für mittels des Typ I und des Typ III Sekretionssystems sekretierte Proteine der Fall ist (Hueck, 1998).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Position
M	N	I	Q	P	T	I	Q	S	G	AS
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Position
I	T	S	Q	N	N	Q	H	H?	Q?	AS

Abb. 49: N-terminale Bestimmung von P54_{EDL933}. AS gibt die Aminosäuresequenz an, Position die Aminosäureposition in der Sequenz. Fragezeichen geben unsichere Aminosäuren innerhalb der Sequenz an.

Einemit *EcoRI* bzw. *SmaI* verdauter chromosomaler DNA aus EHEC EDL933 und mit Hilfe der degenerierten Primer ANK56 oder ANK57 durchgeführte inverse PCR und anschließende Klonierung der PCR-Produkte erbrachte bislang keine Klone, die den vollständig erhaltenen N-Terminus von P54_{EDL933} beinhalten.

EspE ist ein weiteres Protein, das über den Typ III Sekretionsmechanismus ausgeschleust wird (Deibel et al. 1998), jedoch *upstream* von *eaeA* und somit vom in EHEC EDL933 $\Delta sepL$ mutierten LEE-Bereich entfernt kodiert vorliegt. Ein unmittelbarer lokaler Effekt der deletierten Nukleotidsequenz sollte dadurch ausgeschlossen sein. EHEC EDL933 $\Delta sepL$ zeigte in Bezug auf EspE ein verändertes Sekretionsverhalten als der Wildtyp-Stamm, wie durch eine Western Blot Analyse gezeigt werden konnte (s. Abb. 50). Während der Wildtypstamm und die *espD*-Deletionsmutante jeweils eine Bande für das sekretierte EspE aufwiesen, konnten im Kulturüberstand der *sepL*-Deletionsmutante neben EspE mit der richtigen Größe auch mehrere verkürzte EspE-Fragmente detektiert werden. Da in den Kontrollen (s. Abb. 50, A und C) keine Degradationsprodukte von EspE zu sehen waren, deuteten die kürzeren Fragmente darauf hin, dass EspE bereits in verkürzter Form sekretiert wurde. Denkbar wäre, dass ein Chaperon durch die Deletion in *sepL* inaktiv war und dadurch kein Schutz vor proteolytischer Spaltung bestand. Somit waren neben SepL_{EDL933} selbst, den Proteinen des *esp*-Operons (s. 9.) sowie der Sekretion von P54_{EDL933} auch die Sekretion von EspE durch die Deletion von *sepL*_{EDL933} betroffen.

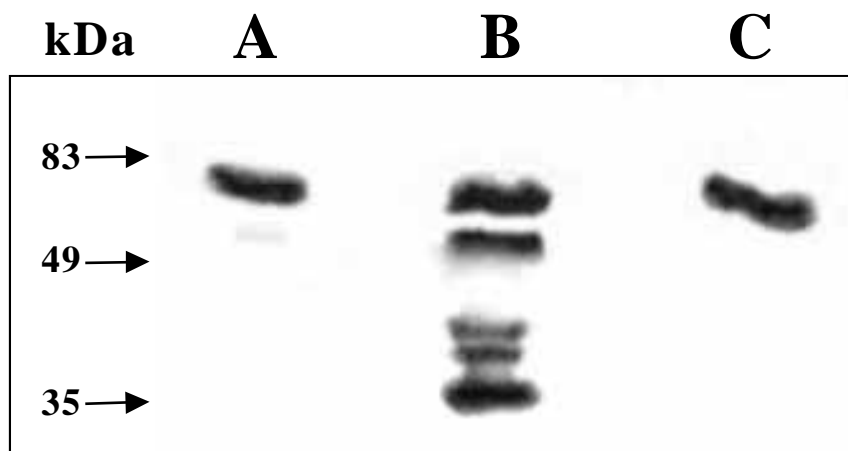


Abb. 50: Veränderte Sekretion von EspE_{EDL933} durch EHEC EDL933 $\Delta sepL$. Die Überstände 'aktivierter' Kulturen von EHEC EDL933 (A), der Deletionsmutante EHEC EDL933 $\Delta sepL$ (B) und der Deletionsmutante EHEC EDL933 $\Delta espD$ (C) wurden TCA-gefällt und jeweils 30 µg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von EspE_{EDL933} erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers mAB B51. Die Position von EspE ist durch einen Pfeil markiert.

6.4. Adhärenz der $\Delta sepL$ _{EDL933}-Mutante

Inwiefern sich die Deletion von *sepL*_{EDL933} auf die Infektiosität von EHEC EDL933 auswirkte, wurde durch qualitative Infektionsstudien ermittelt. Wie ein Plattierungstest ergab, erwies sich die SepL_{EDL933}-Mutante in der Adhärenz im Vergleich zum Wildtypstamm erheblich beeinträchtigt. So adhärte die Deletionsmutante um 83% schlechter als der Wildtyp, aber die Zahl determinierter Kolonie-bildender Einheiten (CFU) war immer noch höher als die aus

Plattierungsexperimenten mit *espA*_{EDL933}- und *espD*_{EDL933}-Mutanten. Allerdings wurde bemerkt, dass viele Bakterien nicht auf den eukaryontischen Zellen, sondern auf dem Deckgläschen hafteten, sodass die ermittelten Werte unter diesem Vorbehalt zu betrachten sind (s. a. 6.6.).

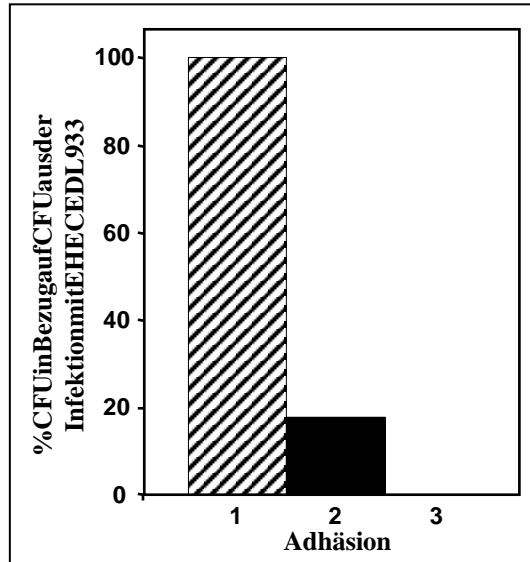


Abb. 51: Adhäsion von EHEC EDL933 Δ *sepL*. Der Wildtyp EHEC EDL933 (1) und die *sepL*_{EDL933}-Mutante EHEC EDL933 Δ *sepL* (2) wurden auf ihre Fähigkeiten, an HeLa-Zellen zu adhären, getestet, wie in II.6.1. beschrieben. Als Negativkontrolle für das Plattierungsexperiment wurde *E. coli* XL1Blue (3) eingesetzt. Die Zahl determinierter Kolonie-bildender Einheiten (CFU) wurde prozentual zu den ermittelten Werten des Wildtypstamms EHEC EDL933 angegeben. Die Differenzen zwischen der *sepL*_{EDL933}-Mutante und dem Wildtyp waren statistisch signifikant ($P \leq 0,05$).

6.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von EDL933 Δ *sepL*

Die schwache Adhärenz von EHEC EDL933 Δ *sepL* an HeLa-Zellen konnte durch immunfluoreszenzmikroskopische Studien unterlegt werden (s. Abb. 52C und D). Hier zeigte sich, dass die Mutante keine Mikrokolonien bildete, dass adhären te Bakterien kein Aktin unterhalb ihrer Berührungsfläche mit HeLa-Zellen ansammelten und dass die HeLa-Zellen kaum Stressfasern aufwiesen. Eine Komplementation der *sepL*-Mutante konnte erreicht werden, indem pAKSK79 *in trans* zur Verfügung gestellt wurde. Sowohl die Adhärenz als auch die Aktinakkumulation bei der Infektion an HeLa-Zellen waren in dieser Komplementationsmutante wiederhergestellt (s. Abb. 52C und D). Die Überexpression von SepL_{EDL933} in der Komplementationsmutante führte offensichtlich auch zur Beeinträchtigung der Detektierbarkeit der Lipopolysaccharide (LPS), da sich viele Bakterien nicht mehr durch das O157-spezifische Antiserum markieren ließen. Möglicherweise wurden auf der Oberfläche der Komplementationsmutante Proteine verstärkt exponiert, die das LPS maskierten.

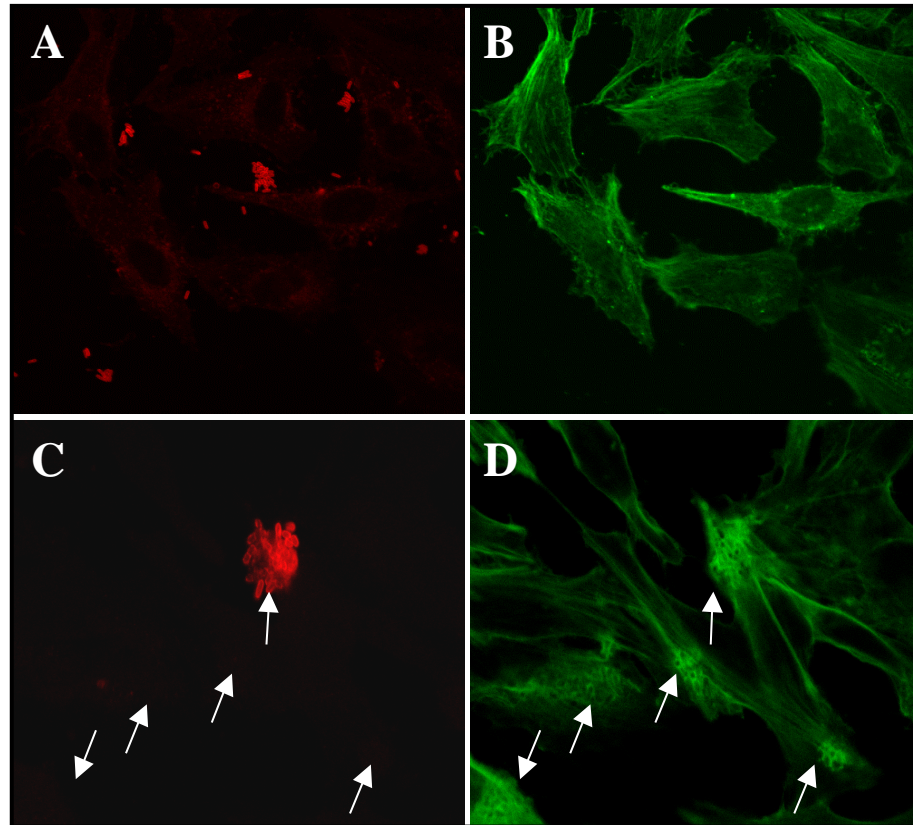


Abb. 52: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Adhärenz von EHEC EDL933 $\Delta sepL$. Gezeigt werden HeLa-Zellen nach 6 h Infektion mit EHEC EDL933 $\Delta sepL$ (A und B) sowie EHEC EDL933 $\Delta sepL$ [pAKSK79] (C und D). Die Bakterien wurden mit AS-anti-O157 und TRITC-gekoppeltem sekundären Antikörper (A und C) und das Aktin der eukaryontischen Zellen mit FITC-gekoppeltem Phalloidin (B und D) markiert. Die Pfeile indizieren Aktinakkumulation unterhalb adhärenter Bakterien (s. Text).

6.6. Elektronenmikroskopische Analyse von EDL933 $\Delta sepL$

Die Infektion von HeLa-Zellen mit EHEC EDL933 $\Delta sepL$ auf Deckgläschen führte dazu, dass die Mutante relativ gut an die Unterlage haftete und so die quantitative Analyse der Adhärenz beeinträchtigte (s. 6.4.). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten jedoch die Befunde aus 6.5., dass die Deletionsmutante nicht an HeLa-Zellen adhärierte (s. Abb. 53A). Überdies konnte gezeigt werden, dass selbst der direkte (forcierte) Kontakt der Bakterien an die eukaryontischen Zellen durch Zentrifugation für 1 min bei 460x g keine Ausbildung von *surface appendages* bewirkte und dass keine Anhaftung von Mikrovilli an die Bakterien erfolgte (s. Abb. 53). Die Komplementation der $\Delta sepL$ -Mutante durch pAKSK79 stellte die Fähigkeit zur Bildung von Mikrokolonien wieder her (s. Abb. 52C) und es wurden Filamente detektiert, die einen Bakterien-Zell-Kontakt etablierten (s. Vergrößerung in Abb. 52D).

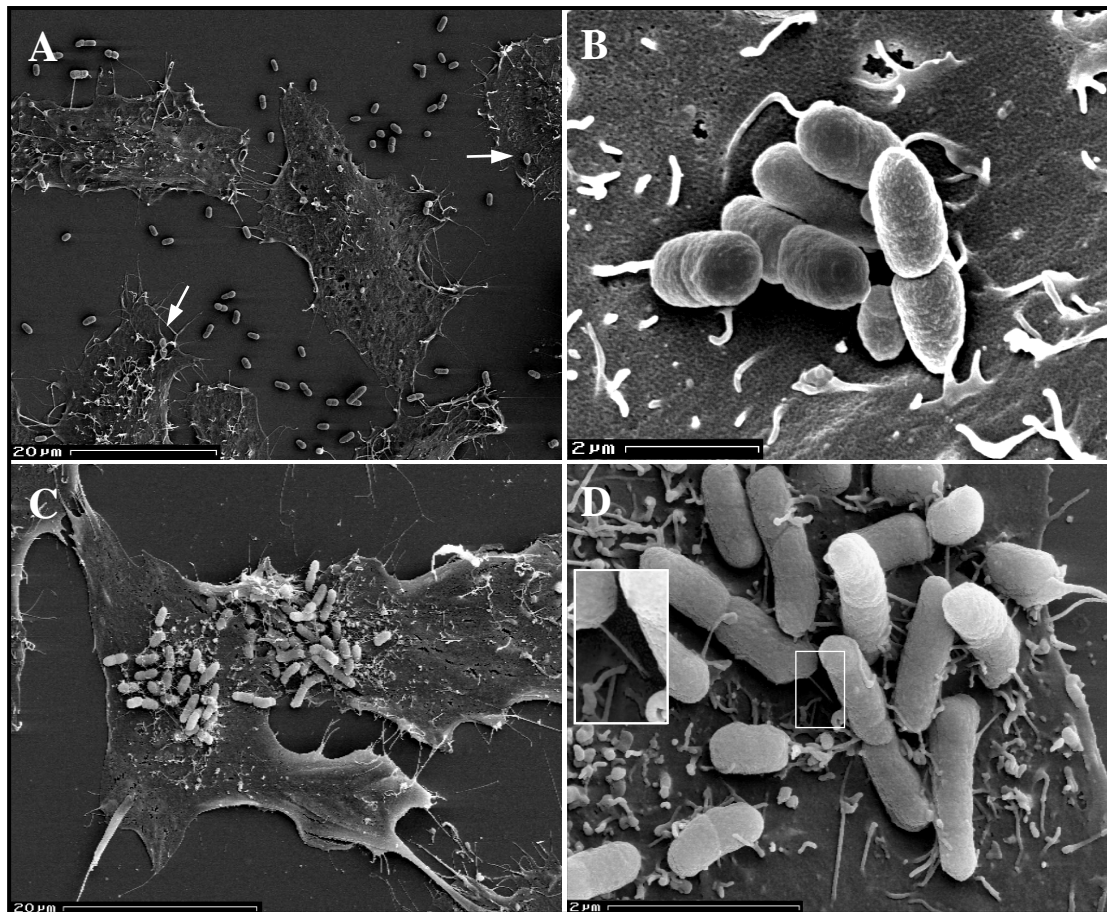


Abb. 53: Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Adhärenz von EHEC EDL933 $\Delta sepL$. HeLa-Zellen wurden mit EHEC EDL933 $\Delta sepL$ (A und B) sowie mit EHEC EDL933 $\Delta sepL$ [pAKSK79] (C und D) infiziert und mit Hilfe der SEM untersucht. (A) EHEC EDL933 $\Delta sepL$ [pAKSK79] wurde nur selten auf oder an den HeLa-Zellen entdeckt (Pfeile). (B) Auf HeLa-Zellen sedimentierte EHEC EDL933 $\Delta sepL$ [pAKSK79] führte keine enge Adhäsion aus, es kam zu keiner Bindung von Mikrofilamenten an die Bakterien und zu keiner Bildung von *surface appendages*. (C) Die Komplementation mutant EHEC EDL933 $\Delta sepL$ [pAKSK79] bildete Mikrokolonien auf HeLa-Zellen. (D) Mikrokolonie von EHEC EDL933 $\Delta sepL$ [pAKSK79] mit Filamenten; Vergrößerung (D) Bakterien-Zell-Kontakt durch *surface appendages*.

6.7. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen SepL_{EDL933}

Die durchgeführten Sequenz- und Proteinanalysen deuteten darauf hin, dass SepL_{EDL933} möglicherweise eine regulatorische Funktion im Rahmen einer Infektion von EHEC an eukaryontischen Zellen einnimmt. Von vielen DNA-bindenden Proteinen, wie z.B. Faktoren der Zwei-Komponenten-Systeme, ist bekannt, dass eine Interaktion zwischen einem Signalrezeptierenden Protein und dem DNA-bindenden Transducer erfolgt. Für Protein-Bindungsstudien zur Detektion möglicher Liganden (s. 6.9.) sowie für die zu erwartende Lokalisierung (s. 6.8.) im Cytoplasma war die Verwendung spezifischer Antikörper notwendig. Mit dem hierfür angestrebten überexprimierten und aufgereinigten Protein sollten zudem DNA-Bindungsstudien (s. 6.10.) durchgeführt werden.

6.7.1. Überexpression von SepL_{EDL933}

Das *sepL*_{EDL933}-Gen wurde mit den Primern ANK10 und ANK11 amplifiziert und in pCR2.1 ligiert. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz wurde *sepL*_{EDL933} aus pCR2.1 durch *Bam*HI/*Kpn*I-Verdau ausgeschnitten und in den Überexpressionsvektor pQE30 ligiert (pANK212). Die Anzucht des rekombinanten Fusionsproduktes His'-SepL_{EDL933} erfolgte im *E. coli*-Stamm M15[pREP4]. Vorversuche zur Überexpression ergaben, dass His'-SepL_{EDL933} in der löslichen Cytoplasma-Fraktion des überexprimierenden Stammes vorlag. Damit konnte das Fusionsprotein auf native Weise aufgereinigt werden (s. Abb. 54). Die Überexpression wurde im 500 ml Maßstab durchgeführt, und die Elution erfolgte in einem kontinuierlichen Gradienten zwischen 0,1 und 0,2 M Imidazol.

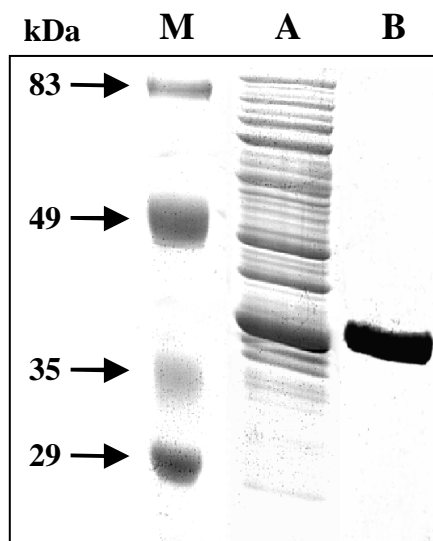


Abb. 54: Überexpression von SepL_{EDL933}. *sepL*_{EDL933} wurde in den Überexpressionsvektor pQE30 kloniert und als His'-SepL_{EDL933} Fusionsprodukt überexprimiert. Die Aufreinigung erfolgte wie im Text beschrieben. Aliquots wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. (M) Molekularer Standard, die Pfeile indizieren die angegebenen Molekulargewichte; (A) Rohextrakt der überexprimierten Kultur; (B) aufgereinigtes His'-SepL_{EDL933} Fusionsprodukt nach Dialyse gegen PBS.

6.7.2. Immunisierung

Die Immunisierung eines Kaninchens mit 100 µg aufgereinigtem His'-SepL_{EDL933} erfolgte durch die Firma Eurogentec (Belgien). Es folgten drei Booster mit jeweils 100 µg Protein.

6.7.3. Aufreinigung des anti-SepL_{EDL933} Antiserums

Das aus der Kaninchen-Immunisierung erhaltene Antiserum gegen SepL_{EDL933} wies eine hohe Konzentration unspezifischer Antikörper auf, wie aus einer Western Blot Analyse mit Gesamtzellextrakten aus dem Wildtyp-Stamm sowie der Deletionsmutante von *sepL*_{EDL933} ersichtlich war (nicht gezeigt). Daher wurde das Antiserum mittels Affinitätsaufreinigung (s. II.8.2.) hochspezifisch gegen SepL_{EDL933} aufbereitet. Das aufgereinigte Antiserum (AS-anti-SepL_{EDL933}) wurde in einer Verdünnung von 1:300 in Western Blot Analysen und 1:100 in immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen eingesetzt.

6.8. Lokalisation von SepL_{EDL933}

EHEC EDL933 wurde durch Anzucht in DMEM mit 100 mM HEPES zur starken Expression und Sekretion der bekannten Esp-Virulenzfaktoren angeregt, was im Anschluss durch Western Blot Analyse bestätigt werden konnte (nicht gezeigt). Die bakterielle Kultur wurde in Überstand (sekretierte Proteine), Periplasma, Cytoplasma und Periplasma, äußere Membran sowie innere Membran fraktioniert. Nach der Proteinbestimmung der erhaltenen Fraktionen wurden gleiche

Proteinmengen (30 µg) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblotting mit AS-anti-SepL_{EDL933} analysiert (s. Abb. 55). Als Kontrolle diente das aufgereinigte Fusionsprodukt His'-SepL_{EDL933} (6 µg), welches bei etwa 41 kDa wegen der zusätzlichen Histidine etwas höher lief als die zu erwartende elektrophoretische Mobilität von SepL_{EDL933} (s. Abb. 55A, theoretisches MW 39,95 kDa). SepL_{EDL933} wurde nicht im Kulturüberstand entdeckt (was auf intakte Zellen zurückschließen ließ). Die Lokalisation von SepL_{EDL933} konnte jedoch mit einer elektrophoretischen Mobilität von etwa 39,3 kDa sowohl auf das Cytoplasma (da das Signal nicht in der Fraktion des Periplasmas auftrat) als auch auf die äußere Membran des Wildtyp-Stammes indiziert werden (s. Abb. 55C und E). Auch die Fraktion der inneren Membran beinhaltete in geringerer Menge SepL_{EDL933} (s. Abb. 55D). Das Auftreten einer etwa 32 kDa großen Bande unterhalb der erwarteten Größe könnte auf ein Abbauprodukt oder auf eine Prozessierung des Proteins hindeuten. Dagegen wurde aus der Western Blot Analyse fraktionierter Zellen von EHEC EDL933 Δ sepL kein Signal erhalten, was das Vorliegen der Deletionsmutante sowie die Spezifität der beobachteten Banden gegen SepL_{EDL933} bekräftigt (s. Abb. 55).

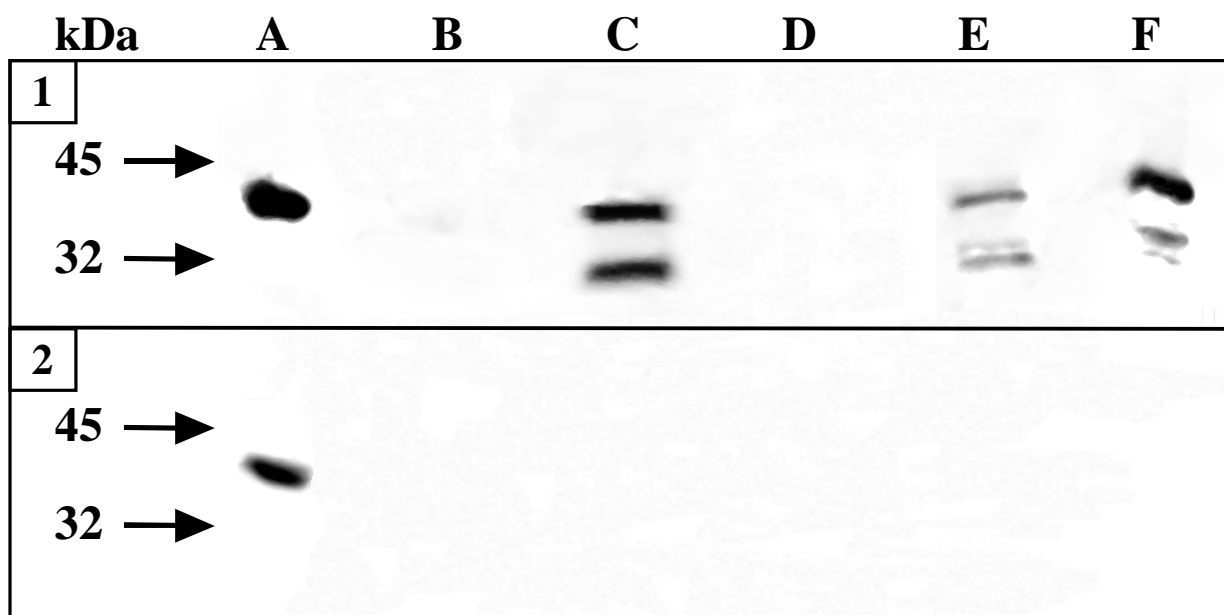


Abb. 55: Lokalisation von SepL_{EDL933}. Die Zellen 'aktivierter' Kulturen von EHEC EDL933 (1) und EHEC EDL933 Δ sepL (2) wurden fraktioniert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Biodyne B Membran geblottet und einer Western Blot Analyse mit Hilfe von AS-anti-SepL_{EDL933} unterzogen. Als Kontrolle diente das aufgereinigte Fusionsprotein His'-SepL_{EDL933}. A, His'-SepL_{EDL933}; B, Kulturüberstand; C, Cytoplasma und Periplasma; D, Periplasma; E, innere Membran; F, äußere Membran.

Bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse EHEC EDL933 infizierter HeLa-Zellen konnte nur für eine geringe Anzahl der Bakterien einer Population SepL auf der bakteriellen Oberfläche detektiert werden (s. Abb. 56). SepL schien dabei über die gesamte Oberfläche verteilt zu sein. Für die Deletionsmutante EHEC EDL933 Δ sepL wurde, wie zu erwarten war, kein SepL detektiert (nicht gezeigt). Hingegen zeigte sich bei der Komplementationsmutante EHEC EDL933 Δ sepL[pAKSK79], bei der das kodierende Gen mit dem respektiven natürlichen

Promotorauf dem *multicopy* Vektor pCR2.1 vorlag, dass SepL auf sehr vielen Bakterien in der Population zu finden war. Offensichtlich erfolgte in der Komplementationsmutante eine gesteigerte Expression von SepL_{EDL933}, die in der Integration in/an die äußere Membran resultierte, so dass SepL_{EDL933} an den meisten Bakterien zu detektieren war. Die übermäßige Exposition von SepL_{EDL933} könnte die schlechte Markierbarkeit von EHEC EDL933Δ*sepL*[pAKSK79] mit AS-anti-O157 erklären, indem bei einer kompetitiven Absättigung der Epitope durch die spezifischen Antikörper die Bindung mit höherer Affinität (SepL_{EDL933}) erhalten blieben und dadurch die anderen Epitope (O157) maskiert wurden.

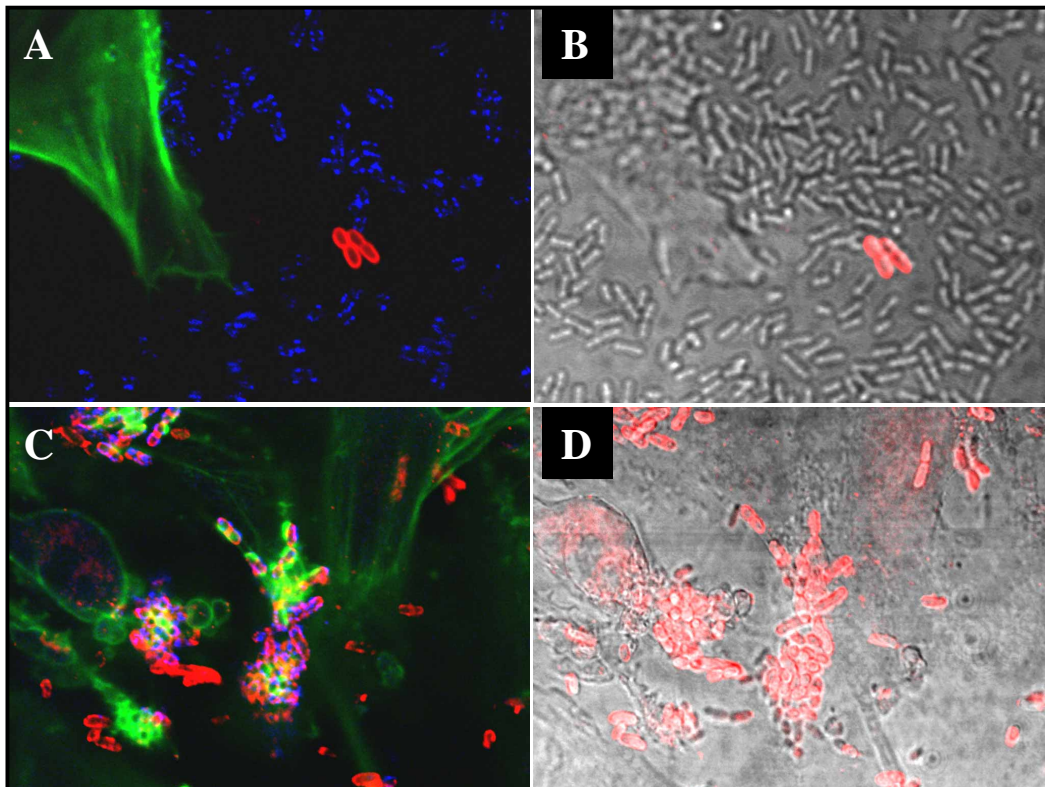


Abb.56: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von SepL_{EDL933} und EspA. HeLa-Zellen wurden 4h mit EHEC EDL933 (A und B) bzw. EHEC EDL933 Δ*sepL*[pAKSK79] (C und D) infiziert. Die Bakterien wurden mit AS-anti-SepL_{EDL933} und TRITC-gekoppeltem sekundären Antikörper, das Aktin der eukaryontischen Zellen mit FITC-gekoppeltem Phalloidin und EspA mit mAb B71 und Cy5-gekoppeltem sekundären Antikörper markiert. Da nicht parallel die Bakterien mit AS-anti-O157 markiert werden konnten, werden zur Lokalisierung der Bakterien *Overlays* mit Phasenkontrast gezeigt. (B) *Overlay* aus Phasenkontrast, Aktin- und SepL_{EDL933}-Markierung. (D) *Overlay* aus Phasenkontrast und SepL_{EDL933}-Markierung.

6.9. SepL_{EDL933}-Protein-Bindungsverhalten

Um eine mögliche Rolle von SepL_{EDL933} zu untersuchen, wurden Interaktionen mit anderen Proteinen analysiert. Die Proteine des Kulturüberstandes von EHEC EDL933 wurden mit TCA gefällt, elektrophoretisch aufgetrennt und immobilisiert. Danach erfolgten die Inkubation mit aufgereinigtem His'-SepL_{EDL933}, Waschen, und die Detektion von SepL_{EDL933} durch AS-anti-SepL_{EDL933} (s. Abb.57). SepL_{EDL933} bindet nach den Ergebnissen dieser Analyse mindestens an

ein sekretiertes Protein von über 90 kDa, somit wahrscheinlich nicht an den Intimin-Rezeptor EspE, der eine elektrophoretische Mobilität von ungefähr 80 kDa in Kulturüberständen von EHECEDL933 aufwies. Zwar erhält der translokierte Intimin-Rezeptor Tiraus EPEC (78 kDa), das Homologon zu EspE aus EHEC, durch Phosphorylierung eine elektrophoretische Mobilität von 90 kDa, aber dies geschieht wahrscheinlicher erst nach der Translokation in die Wirtszelle, da eine durch Phosphorylierung sekretierte Form nicht beschrieben worden ist (Kenny et al. 1997a). Das durch die Bindungsstudien detektierte Protein wurde bemerkenswerterweise nicht von EHEC EDL933 $\Delta sepL$ sekretiert (s. Abb. 57), was wiederum zeigt, dass dieses Protein ein anderes als EspE sein muss, da sonst möglicherweise durch die verkürzten sekretierten EspE-Fragmente (s. 6.3.) mehrere Signale, jedoch wenigstens bei etwa 80 kDa erhalten worden wäre.

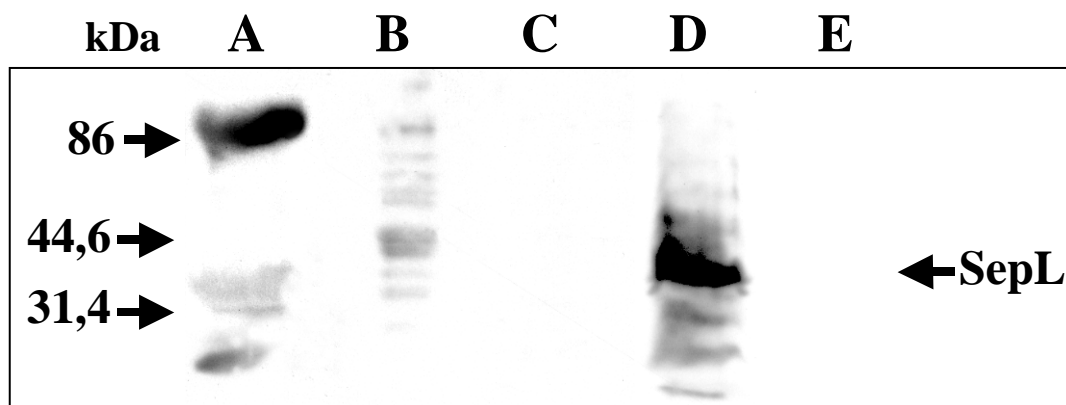


Abb. 57: Bindung von SepL_{EDL933} an Proteine aus EHEC EDL933. EHEC EDL933 (A bis D) wurde fraktioniert, wie in II.7.3.1. und II.7.4. beschrieben, und sekretierte Proteine von EHEC EDL933 $\Delta sepL_{EDL933}$ (E) wurden gefällt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von Protein-bindendem SepL_{EDL933} erfolgte wie unter II.7.9. beschrieben und mit Hilfe von AS-anti-SepL_{EDL933}. (A) Sekretierte Proteine, EDL933; (B) Cytoplasma und Periplasma, EDL933; (C) innere Membran, EDL933; (D) äußere Membran, EDL933; (E) sekretierte Proteine, EDL933 $\Delta sepL_{EDL933}$.

Ob SepL_{EDL933} als Chaperon die Sekretion des >90 kDa großen Proteins unterstützt oder ob die Expression des Chaperons oder des sekretierten Proteins in der $\Delta sepL_{EDL933}$ -Mutante unterbunden ist, bleibt zu klären.

6.10. DNA-Bindungsverhalten von SepL_{EDL933}

Es lagen nach den Ergebnissen der Sequenzanalysen (s. 6.1.) sowie der Untersuchung der Deletionsmutante (s. 6.3.) von SepL_{EDL933} mindestens vier Hinweise auf das Vorliegen eines DNA-bindenden Proteins vor: Ein N-terminales HLH-Motiv wurde detektiert, es wurde eine zur LysR-Familie der Regulatorproteine homologe Domäne gefunden, es wurde ein LZM nachgewiesen, es wurden Übereinstimmungen zum DNA-bindenden KRY-Motiv von DNA-Polymerasen gefunden, und die SepL_{EDL933}-Deletionsmutante exprimiert und sekretiert in vermindertem Maße EspA_{EDL933}, EspD_{EDL933} und EspB_{EDL933} und sekretiert ein ad dato unbekanntes Protein P54_{EDL933}, woraus auf eine möglicherweise veränderte Regulation sekretierter Proteine geschlossen wurde. Da die Regulation der in IR_{EDL933} sekretierten Proteine

betroffen zuseinschienen, wurden DNA-Bindungsstudien mit Gensequenzen dieser Region sowie der gesamten IR_{EDL933} durchgeführt.

6.10.1. South Western Analyse und Gel-Retentionsanalyse

Das aufgereinigte Protein SepL_{EDL933} wurde auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit dem ³²P-markiertem DNA-Fragment IR_{EDL933} aus pANK84 inkubiert (s. II.7.10.). Nach Waschen erfolgte die Detektion der radioaktiv markierten Sonde mit Hilfe eines Phosphorimager Systems. Trotz Wiederholung dieses Versuches konnte keine DNA-Bindung von SepL_{EDL933} an IR_{EDL933} nachgewiesen werden. Weil in dieser South Western Analyse keine Aussage über die Größe des DNA-bindenden Proteins getroffen werden musste, da SepL_{EDL933} aufgereinigt vorlag, wurde auch die elektrophoretische Auftrennung in einem nativen Polyacrylamidgel anstelle des sonst üblichen SDS-Gels (s. II.9.2.2.) durchgeführt. Auch hier wurde keine DNA-Bindung erzielt. Versuche einer Gel-Retention mit aufgereinigtem Protein und PCR-Amplifikaten potentieller Regulationsstellen aus IR_{EDL933} (z.B. des nachgewiesenen Promotor-Bereichs des Esp-Operons, s. 9.) lieferten ebenfalls keine positiven Resultate. Eine DNA-bindende Eigenschaft von SepL_{EDL933} konnte somit weder bestätigt noch dementiert werden. Möglich ist, dass das Fusionsprotein His'-SepL_{EDL933} nicht reaktiv war, dass die Regulationsstelle von SepL_{EDL933} übergeordnet in die Expressionskaskade der Virulenzfaktoren von EHEC eingreift und somit an anderer Stelle als IR_{EDL933} lokalisiert ist oder dass es zur DNA-Bindung von SepL_{EDL933} eines Liganden bzw. einer zweiten Komponente für ein Heterodimer oder der Modifikation von SepL_{EDL933} bedarf. Es wurde in 6.9. gezeigt, dass SepL_{EDL933} an ein sekretiertes Protein der Größe von etwa 90 kDa bindet. Denkbar ist, dass dieses Protein bereits bei der Interaktion im Cytoplasma eine Konformationsänderung bewirkt, die für eine DNA-bindende Aktivität von SepL_{EDL933} notwendig ist. Typische HLHM-Regulationsproteine mit DNA-Bindungs Kapazität besitzen im N-Terminus eine basische α -Helix, die direkt an das HLHM angrenzt (Benezra et al. 1990). Sollte SepL eine DNA-bindende Funktion besitzen, dann sicherlich über die in 6.1. aufgezeigten positiven Bereiche. Andererseits könnte die Regulation der Expression mittels SepL_{EDL933} auch in indirekter Weise erfolgen, indem eine Inaktivierung anderer Regulatoren mit HLHM durch eine Heterodimerisierung mit Hilfe dieses Motivs erfolgt (Benezra et al. 1990). Für die Aufklärung der regulatorischen Funktion von SepL bedarf es weiterführender Experimente wie z.B. den allgemeinen Nachweis der DNA-bindenden Eigenschaft von SepL. Eine möglicherweise hierfür geeignete Methode ist die *random-Oligomer-Selektion* nach Pollock und Treisman (Pollock und Treisman, 1990), durch die neben dem Nachweis der DNA-Bindung auch die spezifische Nukleotidsequenz determiniert werden kann. Weiterhin sollte in Betracht gezogen werden, dass SepL möglicherweise ein multifunktionales Protein ist. Einige Chaperone des Typ III Sekretionsystems üben neben ihrer Aufgabe als Protektor für die zu sekretierenden Proteine möglicherweise auch eine regulatorische Funktion aus (Williams und Straley, 1998; Neyt und Cornelis, 1999; Francis und Wolf-Watz, 1998). Das Fehlen von SepL zu sekretierten Abbauprodukten von EspE führte, könnte SepL ein Chaperon für EspE oder ein Regulator für die Expression des EspE-spezifischen Chaperons sein.

7. Charakterisierung von Pas

Das erste Gen downstream von *eaeA*_{EDL933} ist *pas*_{EDL933}. Dieses Gen war bis Februar 1998 nicht in der Datenbank veröffentlicht. Selbst als die gesamte LEE-Sequenz aus EPEC E2348/69 am 12.2.1998 in der EMBL-Datenbank erschien, war in dem analogen Sequenzbereich kein durchgehendes Leseraster erkennbar, was nachweislich an *mismatches* in der veröffentlichten Sequenz lag. Erst nach zwei weiteren Korrekturen der EPEC-Sequenz in der Datenbank war das zuzuerwartende *pas*-Nukleotidsequenz aus EHEC EDL933 homologe ORF annotiert und wurde, gemäß einem von Elliott et al. zur gleichen Zeit veröffentlichten Vorschlag zur Nomenklatur von Genen pathogener *E. coli* (Elliott et al. 1998) als *escD* ('*E. coli* protein for secretion') bezeichnet. Zu diesem späten Zeitpunkt war die Veröffentlichung über *pas*_{EDL933} bereits eingereicht und darin das Gen als *pas* für 'protein associated with secretion' bezeichnet.

7.1. Sequenzanalyse von *pas*_{EDL933}

Das offene Leseraster von *pas*_{EDL933} liegt downstream von *eaeA* und in entgegengesetzter Orientierung. Auf diesem Strang ist *pas*_{EDL933} von keinem weiteren ORF benachbart, und eine Nukleotidsequenz ähnelt einem rho-unabhängigen Terminator 221 bis 253 bp downstream vom TAA-Stopcodon sowie die Vorhersage eines potentiellen Stickstoffregulierten Promotors 273 bp upstream vom ATG-Startcodon lassen den Schluss auf eine monocistronische Transkription von *pas*_{EDL933} zu. Die 1221 bp lange Sequenz kodiert für 406 aa mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 45259 Da und einem pI-Wert von 6,96, und ist mit einem Wert von 105 sehr aliphatisch.

Um die Konservierung in anderen STEC-Stämmen zu überprüfen, wurden die *pas*-Gene aus EHEC E32511/0 und STEC 413.89-1 kloniert und sequenziert. Die Homologien auf Basis der Aminosäuresequenz waren mit 97,3% bzw. 99,5% Identität und 98% bzw. 99,5% Similarität im Vergleich zu *Pas*_{EDL933} signifikant. Diese Daten zeigten, dass *Pas* innerhalb von STEC stark konserviert ist. Die ebenfalls hohe Homologie zu *EscD* aus EPEC E2348/69 sowie weitere homologe Virulenzfaktoren sind in Tab. 15 angegeben.

Die Analyse der Aminosäuresequenz mit PSORT (Nakai und Kanehisa, 1991) ergab, dass *Pas*_{EDL933} keine N-terminale Signalsequenz besaß, und die vorhergesagte Topologie war die bakterielle innere Membran. Diese Vorhersage stimmte mit der Beschreibung des homologen Protein YscD aus *Yersinia pestis* überein, dessen Funktion als Bestandteil des Typ III Sekretionssystems im Transport von Virulenzfaktoren durch die bakterielle Membran und dessen Lokalisation in der inneren Membran bestimmt worden war (Plan und Straley, 1995). PscD aus *Pseudomonas aeruginosa* ist ebenfalls ein Bestandteil des Typ III Sekretionssystems und damit notwendig für den Transport von Virulenzfaktoren aus *Pseudomonas*. Der Vergleich der Hydrophobizitätsplots mit Hilfe des TopPred II (Claros und von Heijne, 1994) und des Kyte-Doolittle Algorithmus (Kyte und Doolittle, 1982) zeigte markante strukturelle Ähnlichkeit der homologen Aminosäuresequenzen *Pas*_{EDL933}, YscD und PscD. Für *Pas*_{EDL933} wurden zwei sichere Transmembranmodelle im N-terminalen Bereich vorhergesagt (TM1 und TM2, s. Abb. 58).

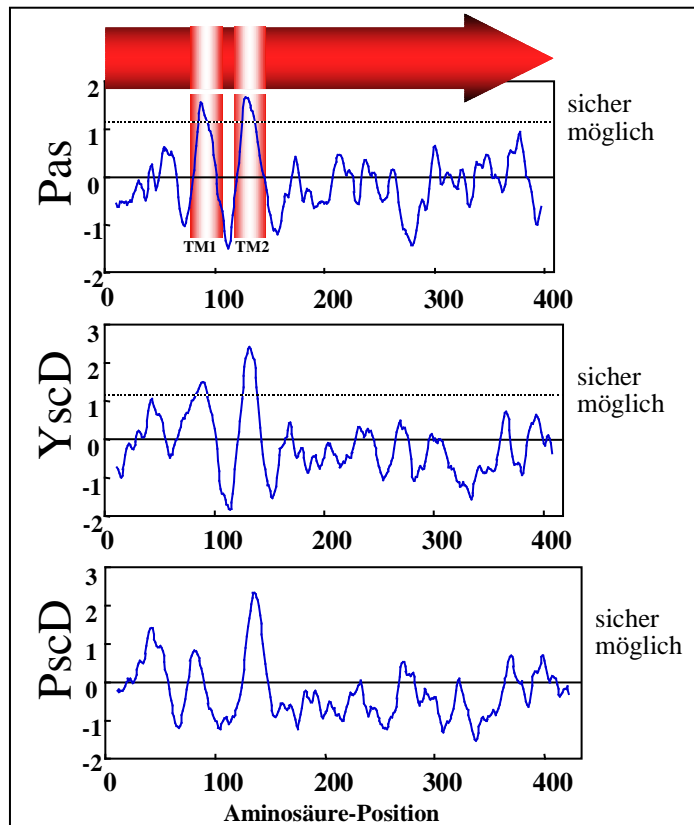


Abb.58:Hydrophobizitätsplots für Pas_{EDL933} und die Pas homologen Proteine YscD und PscD. Die Aminosäuresequenzen von Pas_{EDL933}, PscD (EMBL *acc.no.* U56077) und YscD (EMBL *acc.no.* M74011) wurden mit dem Programm TopPredII und dem Kyte-Doolittle Algorithmus analysiert (Kyte und Doolittle, 1982; Claros und von Heijne, 1994). Der Pfeil repräsentiert Pas_{EDL933}, die beiden Balken im Pfeil sowie die entsprechenden Unterlegungen im Hydrophobizitätsplot zeigen zwei sichere Transmembrandomänen in Pas_{EDL933} an.

TM2 wies in der Datenbank-Recherche signifikante Homologien zu anderen bakteriellen Permeasen auf, so dass von einem einheitlichen Konsensus-Motiv für diese Familie bakterieller Transportproteine gesprochen werden darf (s. Abb.59):

Rx[KP]Rx[ILV][LMA]Ax[VL][IV]G[AGC][AT]x[AG]xSGA[IVL]x[SQ]x₄[SN]P[KL][AG][EDS]P.

	* R L P R L L L A S V I G A A L A V S G A I G Q Y V L L N P L A E P *	Konsensus Mehrheit
	124 134 144	
115	R K K R L I L A S V I G A T F A L S G A I G S Y V L L S P K A E P	Pas _{EDL933}
115	R K K R L I L A S V I G A T F A L S G A I G S Y V L L S P K A E P	Pas _{E32511/0}
115	R K K R L I L A S V I G A A I A L S G A I G S Y V L L S P K A E P	Pas _{413.89-1}
116	R K K R L I L A S V I G A T F A L S G A I G S Y V L L S P K A E P	EscD _{EPEC}
30	R K K R L I L A S V I G A A I A L S G A I G S Y V L L S P K A E P	Pas _{RDEC-1}
53	R L P R V L L A V V V G C A L A V S G A I M Q G L F R N P L A D P	HemU _{YEREN}
59	R L P R V L M A L L I G A A L G V S G A I F Q S L M R N P L G S P	FepG _{ECOLI}
69	R M P R M L M A L L I G A A L G V S G A I F Q A L T R N P L G S P	FxuA _{MYCSM}
56	R L P R T L A V L L V G A A L A I S G A V M Q A L F E N P L A E P	BtuC _{ECOLI}
77	R L P R V V L A A L V G G A L A V S G L I L Q A M I R N P L A S P	CbrC _{ERWCH}
51	R L P R L L L A L F V G A A L A V A G V L I Q G I V R N P L A S P	FecD _{ECOLI}

Abb. 59: Vergleich zwischen Pas_{EDL933} und bakteriellen Permeasen. Die N-terminale Region des Proteins enthält zwei vorhergesagte Transmembrandomänen (P_{78-D98} und R_{115-P148}). Aminosäuren, die an einer Position überwiegen, sind in 'Mehrheit' angegeben, konservierte Aminosäuren sind darüberhinaus im Alignment fett geschrieben und in der Zeile 'Konsensus' mit einem Stern markiert. Pas_{EDL933}, EHEC EDL933; Pas_{E32511/0}, EHEC E2511/0; Pas_{413.89-1}, STEC 413.89-1; Pas_{RDEC-1}, kaninchenpathogenes EPEC RDEC-1 (EMBL acc.no. U59503); HemU, *Y. enterocolitica* (SPTREMBL acc.no. P74980); FepG, *E. coli* (SWISSPROT acc.no. P23877); FxuA, *Mycobacterium smegmatis* (SPTREMBL acc.no. Q50376); BtuC, *E. coli* (SWISSPROT acc.no. P06609); CbrC, *Erwinia chrysanthemi* (SWISSNEW acc.no. Q47086); FecD, *E. coli* (SWISSPROT acc.no. P15029).

7.2. Konstruktion einer *in-frame* Deletionsmutante von *pas*_{EDL933} und Analyse der sekretierten Proteine von EHEC EDL933 Δ *pas*

Mittels OE-PCR und homologer Rekombination, wie unter II.9.6.3. beschrieben und analog zu 4.2., wurde eine *in-frame* Deletion von *pas*_{EDL933} generiert, die lediglich 100 bp des 5'-Endes und 161 bp des 3'-Endes des Gens beinhaltete (s. Abb. 60; Kresse et al. 1998). Somit waren 320 aa des Proteins deletiert. Die Deletionsmutante EHEC EDL933 Δ *pas* zeigte sich in ihrer Fähigkeit, die Proteine EspA_{EDL933}, EspB_{EDL933}, und EspD_{EDL933} zu sekretieren, stark beeinträchtigt, wie mit Hilfe von Western Blot Analysen nachgewiesen werden konnte (Kresse et al. 1998). Hingegen war die intrazelluläre Expression dieser Proteine nicht verändert. Die Sekretion von EspA_{EDL933}, EspB_{EDL933} und EspD_{EDL933} konnte durch die in pCR 2.1 ligierte und *in trans* zur Verfügung gestellte vollständige Gensequenz von *pas*_{EDL933} in EHEC EDL933 Δ *pas* wiederhergestellt werden (Kresse et al. 1998).

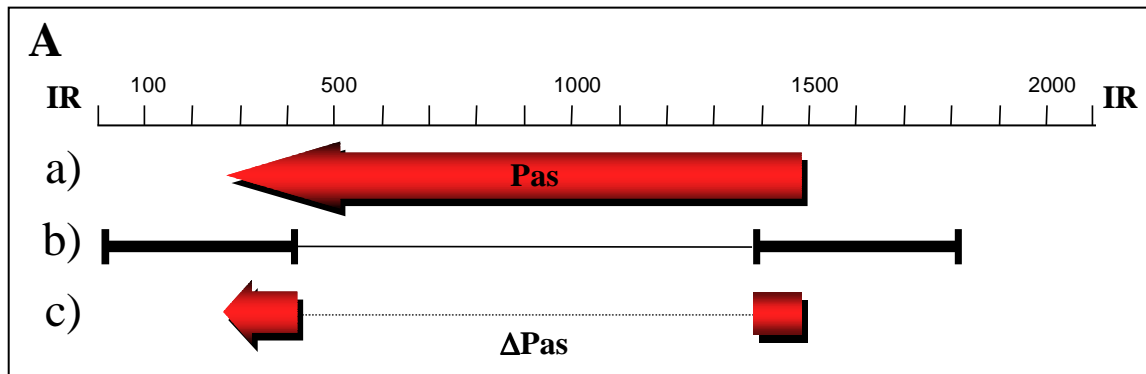


Abb. 60: Schematische Darstellung der Deletion von *pas*_{EDL933}. Gestrichelte Linien im Schema zeigen deletierte Bereiche an. (a) Position von *pas* innerhalb der IR_{EDL933}. (b) Position der Deletionsprimern resultierenden Deletionsfragmente und deletierter ORF.

Neben den für die *pas*_{EDL933}-Deletionsmutante untersuchten Proteinen EspA, EspD und EspB, die auf einem Operon kodiert vorliegen (s. 9.), sind noch weitere Proteine für die Pathogenität von EHEC notwendig, die über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleust werden. Es ist für das EspE homologe Tir Protein aus EPEC E2348/69 vermutet worden, dass die Sekretion nicht mittels des Typ III Sekretionssystems erfolgte, da dem analysierten N-Terminus von Tir aus den Kulturüberständen von EPEC E2348/69 das Methionin fehlte (Kenny et al. 1997b), obgleich bekannt war, dass ein funktionsfähiges Typ III Sekretionssystem für die Translokation des bakteriellen Intimin-Rezeptors in die Membran der Wirtszelle notwendig ist (Wolff et al. 1998; Kenny et al. 1997b; Jarvis et al. 1995). Mit der Deletion von *pas*_{EDL933} war möglicherweise ein Transportprotein des Typ III Sekretionssystems ausgeschaltet und somit die Sekretion über diesen Mechanismus nicht mehr möglich. Daher wurde die Sekretion von EspE in dieser Mutante mittels Western Blot Analyse von Kulturüberständen untersucht. Der Wildtyp EHEC EDL933 sekretierte EspE wie erwartet in den Kulturüberstand, während der gefällte Überstand von EHEC EDL933 Δpas auf der Höhe von EspE kein Signal im Western Blot aufwies (s. Abb. 61). Gesamtzellextrakte vom Wildtyp und von der *pas*_{EDL933}-Mutante unterlegten, dass EspE sehr wohl exprimiert wurde (nicht gezeigt). Daraus ließ sich folgern, dass nicht nur die Translokation, sondern bereits die Sekretion des Intimin-Rezeptors EspE von einem intakten Typ III Sekretionssystem abhängig ist.

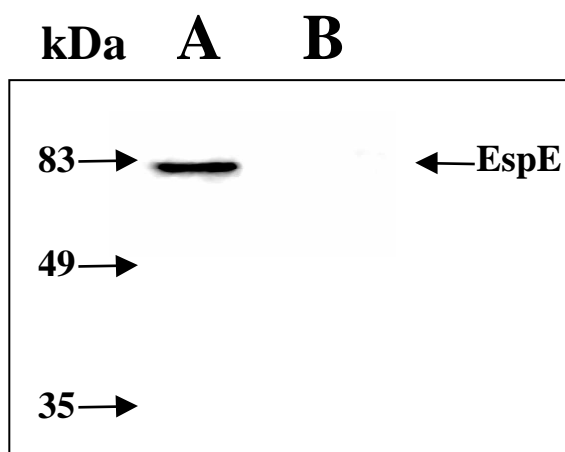


Abb. 61: Sekretion von EspE in EHEC EDL933 Δpas . TCA-gefällte Kulturüberstände von EHEC EDL933 (A) und EHEC EDL933 Δpas wurden mittels Western Blot Analyse mit mAb-anti-EspE untersucht. Die Sekretion von EspE_{EDL933} war in der *pas*_{EDL933}-Mutante unterbunden. Die Position von EspE wird durch einen Pfeil markiert.

7.3. Adhärenz und Invasivität der Δpas_{EDL933} -Mutante

Die Deletionsmutante von pas_{EDL933} wurde in parallelen Versuchen zu 7.2. in ihren virulenten Eigenschaften untersucht. HeLa-Zellen wurden mit 'aktivierten' Bakterien infiziert und sowohl Plattierungs- als auch Invasionsversuchen unterzogen. Die Adhärenz von EHEC EDL933 Δpas an HeLa-Zellen war um über 3 log-Einheiten vermindert (0,4% im Vergleich zum Wildtyp) und lag somit im Bereich der Negativkontrolle *E. coli* XL1Blue (s. Abb. 62A). Die Komplementation *in trans* durch pKSC2 führte zu einer Adhärenz von 16,6% gegenüber dem Wildtyp. Vergleichbare Werte zeigten sich bei Invasionsversuchen, in denen die pas_{EDL933} -Mutante nur zu 0,2% in der Gegenüberstellung zum Wildtyp invadierte (s. Abb. 62B). Auch hier wurde durch die zur Verfügungstellung von pas_{EDL933} *in trans* eine partielle Komplementation von EHEC EDL933 Δpas erreicht. Die Negativkontrolle *E. coli* XL1Blue zeigte hier sehr deutlich keine invasiven Fähigkeiten (0%).

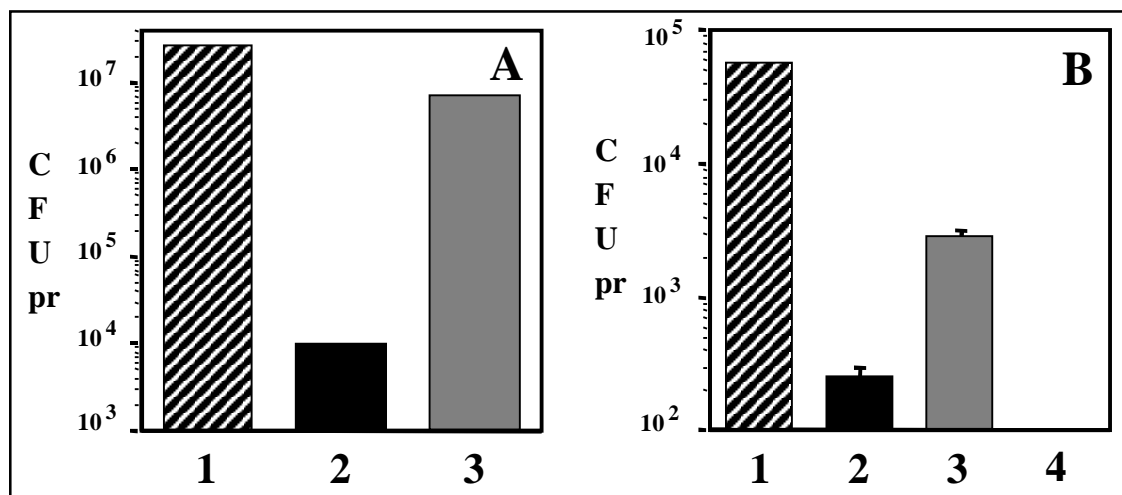


Abb. 62: Adhäsion und Invasion von EHEC EDL933 Δpas . Der Wildtyp EHEC EDL933 (1), die pas_{EDL933} -Mutante EHEC EDL933 Δpas (2) sowie die Komplementationsmutante EHEC EDL933 Δpas [pKSC2] (3) wurden auf ihre Fähigkeiten, an HeLa-Zellen zu adhären (A) bzw. HeLa-Zellen zu invadieren (B), getestet, wie in II.6.1. beschrieben. Als Negativkontrolle für den Invasions test wurde *E. coli* XL1Blue (4) eingesetzt. Die Differenzen zwischen der pas_{EDL933} -Mutante und sowohl dem Wildtyp wie auch der Komplementationsmutante waren statistisch signifikant ($P \leq 0,05$).

7.4. Elektronenmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 Δpas -infizierten HeLa-Zellen

Die Darstellung des Verlustes adhärenter und invasiver Eigenschaften von EHEC EDL933 Δpas wurde durch rasterelektronenmikroskopische Analysen ergänzt. Die Infektion des Wildtyp-Stammes EHEC EDL933 führte zur Bildung von Mikrokolonien auf den HeLa-Zellen mit durchschnittlich 50-90 Bakterien/HeLa-Zelle (s. Abb. 63A). Die Bakterien waren vielfach von Mikrovilli der Wirtszelle umschlungen und bildeten ihrerseits die in 4.7. beschriebenen EspA-Filamente aus (s. Pfeil in Abb. 63). Die Invasion des Wildtyps in HeLa-Zellen konnte durch Ultradünnschnitte und Transmissionselektronenmikroskopie nachgewiesen werden (s. Abb. 63B). Im Gegensatz hierzu erwies sich die pas_{EDL933} -Mutante, wie bereits in 7.3. beschrieben,

sehr eingeschränkt bezüglich Adhärenz und Invasivität. Die sehr wenigen entdeckten Bakterien, die an HeLa-Zellen anhafteten, waren nicht von Mikrovilli umschlungen und schienen eher zufällig aufzuliegen (s. Abb. 63C). EspA-Filamentähnliche Strukturen wurden nicht beobachtet, und trotz ausgiebigen Screenings von Ultradünnschnitten wurde kein intrazelluläres Bakterium gefunden (s. Abb. 63D).

EHEC EDL933 Δpas [pKSC2] adhärte hingegen an die HeLa-Zellen und bildete Mikrokolonien (a. Abb. 63E). Ebenso konnten in der Analyse von Ultradünnschnitten intrazelluläre Bakterien nachgewiesen werden (s. Abb. 63F).

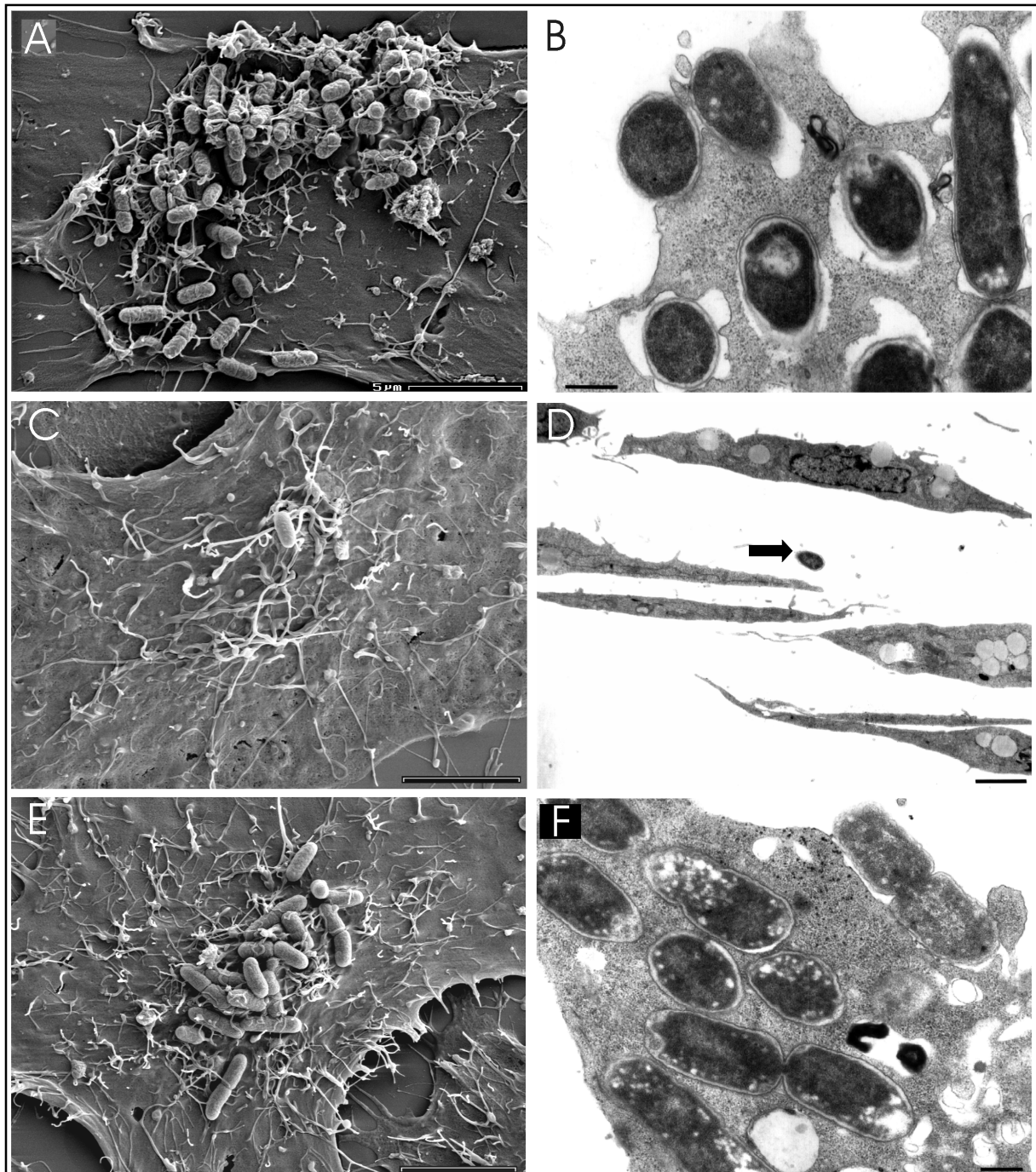


Abb. 63: Elektronenmikroskopische Analyse von Adhäsion und Invasion von EHEC EDL933 Δpas . Die Adhäsivität und Invasivität von EHEC EDL933 (A und B), EHEC EDL933 Δpas (C und D) und EHEC EDL933 Δpas [pKSC2] (E und F) nach 6 h Infektion von HeLa-Zellen wurden mittels

rasterelektronenmikroskopischer (A, C und E) und transmissionselektronenmikroskopischer (B, D und F) Verfahren untersucht. In D ist ein einzelnes nicht-adhärrierendes Bakterium durch einen Pfeil hervorgehoben. Balken repräsentieren 5 μm (A, C und E) bzw. 2,5 μm (B, D und F).

7.5. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von EHEC EDL933 Δpas

Es sollten die aus 7.3. und 7.4. gefundenen Ergebnisse durch Immunfluoreszenz bestätigt werden. Zudem war es von Interesse, ob die wenigen adhärenen Bakterien nach einer Infektion von EHEC EDL933 Δpas an HeLa-Zellen in der Lage waren, eine Signaltransduktion durchzuführen und Aktin zu akkumulieren. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen bestätigten, dass der Wildtyp in Mikrokolonien an die HeLa-Zellen adhärte und die Akkumulation von Aktin unterhalb der Bakterien verursachte (s. Abb. 64A und B), während EHEC EDL933 Δpas nicht mehr in der Lage war, an die HeLa-Zellen zu adhären (s. Abb. 64C und D). Es fand sich zwar noch sehr vereinzelt Bakterien auf den Zellen, aber unterhalb dieser war in der eukaryontischen Zelle keine Aktin-Akkumulationen durch Phalloidin-FITC Anfärbung sichtbar (s. Pfeile in Abb. 64C und D). Zudem wiesen die HeLa-Zellen nach 6 h Infektion mit EHEC EDL933 Δpas nicht die für die Infektion mit dem Wildtyp-stammtypischen Stressfasern auf. Demnach erfolgte bei der pas_{EDL933} -Mutante keine Signaltransduktion, die zur Aktinakkumulation oder zu anderen Veränderungen des Aktingerüsts geführt hätte. Bei der Infektion mit EHEC EDL933 Δpas [pKSC2] waren hingegen wieder adhärenen Bakterien nachweisbar, die in Mikrokolonien auf den HeLa-Zellen aggregierten und eine Aktin-Akkumulation induzierten (s. Abb. 64E und F).

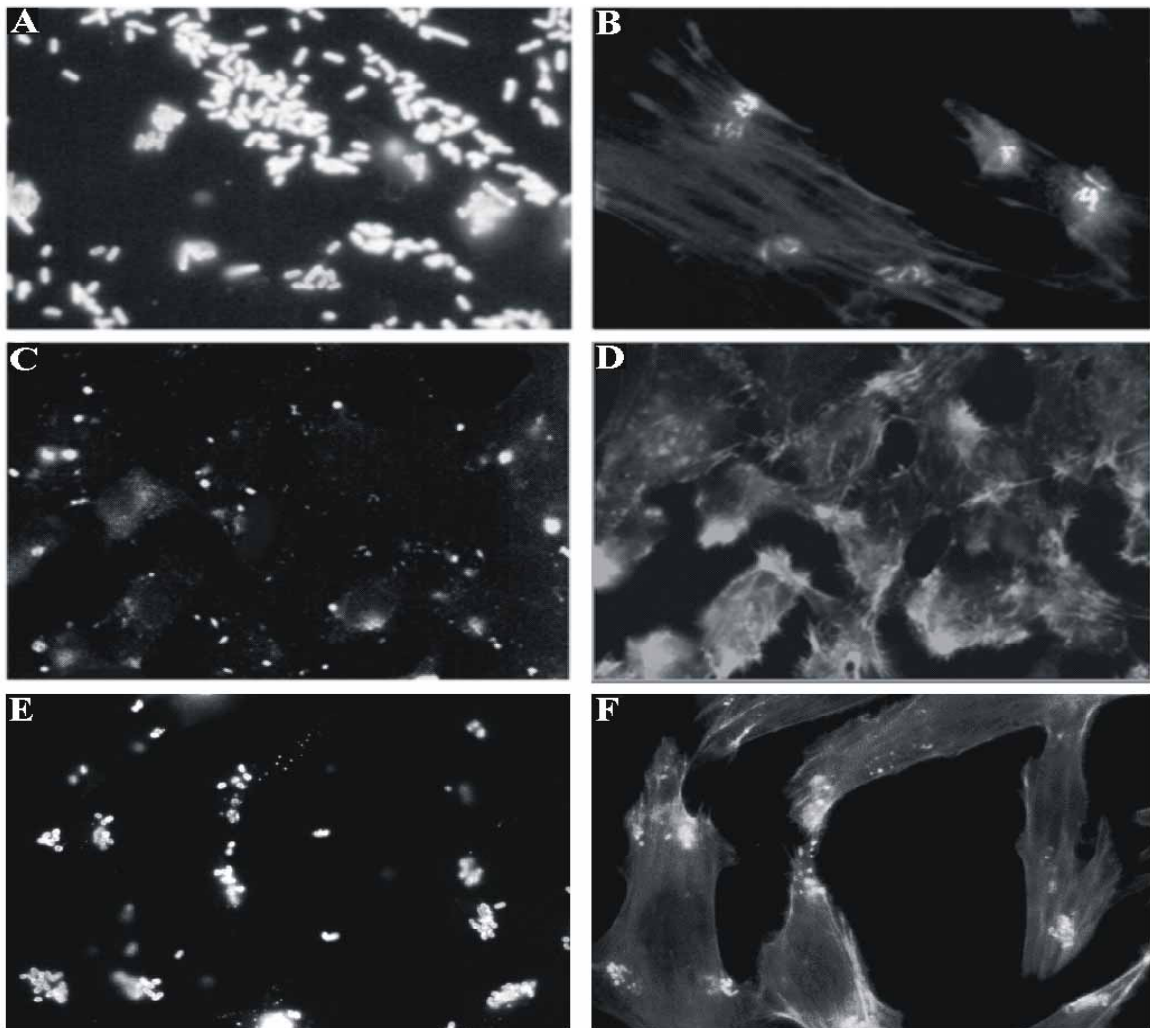


Abb. 64: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Adhärenz von EHEC EDL933 Δpas . Gezeigt werden HeLa-Zellen nach 6h Infektion mit EHEC EDL933 (A und B), EHEC EDL933 Δpas (C und D) sowie EHEC EDL933 Δpas [pKSC2] (E und F). Die Bakterien wurden mit AS-anti-O157 und TRITC-gekoppeltem sekundären Antikörper (A, C und E) und das Aktin der eukaryontischen Zellen mit FITC-gekoppeltem Phalloidin (B, D und F) markiert.

Die Ergebnisse aus 7.4. und 7.5. unterstützen die Vermutung, dass das Typ III Sekretionssystem und die sekretierten Proteine grundlegend an der Initialbindung der Bakterien an die Epithelzellen beteiligt sind. Mit der Inhibition der Sekretion der Esp-Proteine ging auch ein absoluter Verlust der Adhärenz einher; somit existieren keine weiteren Adhäsionsfaktoren in EHEC, die wie z.B. die BFP in EPEC diesen Verlust maskieren würden.

7.6. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Pas_{EDL933}

Pas_{EDL933} war für die Sekretion, nicht aber für die Expression der für die Virulenz von EHEC EDL933 wichtigen Esp-Proteine notwendig. Aufgrund der allgemeingültigen Funktion für alle bis dahin untersuchten sekretierten Proteine (EspA, EspB, EspD und EspE) und wegen der für Chaperone des Typ III Sekretionssystems (Wattiau et al. 1994) fehlenden charakteristischen Eigenschaften kleines Molekulargewicht, saurer pI-Wert und amphipatische α -Helix im C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz durfte davon ausgegangen werden, dass es sich bei

Pas_{EDL933} nicht um ein Chaperon des Typ III Sekretionssystems handelte. Zudem waren für die Proteine EspB und EspB/EspD aus EPEC bereits potentielle Chaperone identifiziert worden (Wainwright und Kaper, 1998; Donnenberg et al. 1997), deren Homologe auch in EHEC EDL933 kodiert vorliegen. Die fortführende Untersuchung von Pas_{EDL933} zur Aufklärung der Lokalisation und der Protein bindenden Eigenschaften sollte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Pas_{EDL933} erfolgen.

7.6.1. Überexpression von Pas_{EDL933}

Das *pas*_{EDL933}-Gen wurde mit den Primern ANK49 und ANK50 amplifiziert und in pCR2.1 ligiert (pANK194). Nach Bestätigung der korrekten Sequenz durch Sequenzierung wurde *pas*_{EDL933} aus pANK194 durch *Bam*HI/*Kpn*I-Verdau ausgeschnitten und in den Überexpressionsvektor pQE30 ligiert (pANK198). Die Anzucht des rekombinanten Fusionsproduktes His'-Pas_{EDL933} erfolgte im *E. coli*-Stamm M15[pREP4]. Vorversuche zur Überexpression ergaben, dass His'-Pas_{EDL933} in einer unlöslichen Fraktion des überexprimierenden Stammes vorlag. Somit musste das Fusionsprotein auf denaturierende Weise aufgereinigt werden (s. Abb. 65). Die Überexpression und Aufreinigung erfolgten im 500 ml Maßstab unter denaturierenden Bedingungen nach Angaben des Herstellers. Die Elution von His'-Pas_{EDL933} erfolgte in Puffer F.

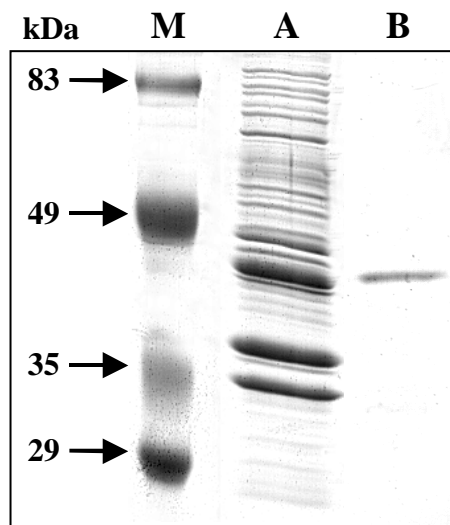


Abb. 65: Überexpression und Aufreinigung des His'-Pas_{EDL933} Fusionsproduktes. *pas*_{EDL933} wurde in den Überexpressionsvektor pQE30 kloniert und als His'-Pas_{EDL933} Fusionsprodukt überexprimiert. Die Aufreinigung erfolgte wie in 7.6.1. beschrieben. Aliquots wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. (M) Molekularer Standard, die Pfeile indizieren die angegebenen Molekulargewichte; (A) Rohextrakt der überexprimierten Kultur; (B) aufgereinigtes His'-Pas_{EDL933} Fusionsprodukt nach Dialyse gegen PBS. Die Position des überexprimierten Fusionsproduktes wird durch einen Pfeil markiert.

7.6.2. Immunisierung

Jeweils 50 µg aufgereinigtes His'-Pas_{EDL933} wurde mit dem gleichen Volumen des inkompletten Freund'schen Adjuvans versetzt und intraperitoneal einer C57BL/6-Maus gespritzt. Nach 15 Tagen erfolgte der erste Booster, und weitere 15 Tage später wurde das Blut gesammelt, und die spezifischen Pas_{EDL933} Antikörper (AS-anti-Pas_{EDL933}) wurden abgetrennt und bei -20°C gelagert. Die Immunspezifität von AS-anti-Pas_{EDL933} wurde durch ELISA und Western Blot ermittelt (nicht gezeigt). In der Western Blot Analyse mit Gesamtzellextrakt aus EHEC EDL933 und EHEC EDL933 Δ *pas* konnte in beiden Proben bei etwa 37 kDa ein unspezifisches Signal detektiert werden, welches in den folgenden Analysen ausgeschlossen wurde.

7.7. Lokalisation von Pas_{EDL933}

EHEC EDL933 wurde durch Anzucht in DMEM mit 100 mM HEPES zur starken Expression und Sekretion der bekannten Esp-Virulenzfaktoren angeregt, was im Anschluss durch Western Blot Analyse bestätigt werden konnte (nicht gezeigt). Die bakterielle Kultur wurde in Überstand (sekretierte Proteine), Periplasma, Cytoplasma und Periplasma, äußere Membran und innere Membran fraktioniert. Nach der Proteinbestimmung der erhaltenen Fraktionen wurden gleiche Proteinmengen (30 µg) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblotting AS-anti-Pas_{EDL933} analysiert (s. Abb. 66). Als Kontrolle diente das aufgereinigte Fusionsprodukt His'-Pas_{EDL933} (6 µg), welches bei ca. 46 kDa wegen der zusätzlichen Histidine etwas höher lief als die zu erwartende elektrophoretische Mobilität von Pas_{EDL933} (theoretisches MW 45,3 kDa). Pas_{EDL933} wurde weder im Kulturüberstand (was auf intakte Zellen zurückschließen ließe), noch in der äußeren Membran oder im Periplasma von EHEC EDL933 entdeckt (s. Abb. 66B, C und E). Hingegen konnte eine Hauptbande von etwa 45 kDa und zwei schwächer reagierende Banden bei 51 kDa und 59 kDa in der cytoplasmatischen Fraktion von EHEC EDL933 detektiert werden (s. Abb. 66F). Die Hauptbande hier zeigte die erwartete elektrophoretische Mobilität. Allerdings widersprach diese Lokalisation der vorhergesagten Topologie innerhalb der bakteriellen inneren Membran. Das Vorhandensein eines Proteins in der Fraktion der inneren Membran, das mit dem Pas_{EDL933} spezifischen Antiserum reagierte, passte eher zur Topologie-Vorhersage, wobei dieses Protein mit etwa 51 kDa um 6 kDa größer zu sein schien als das *bonafide* 45 kDa Protein des Cytoplasmas (s. Abb. 66D). Jedoch stimmte die Mobilität dieser und zweier weiterer Banden - einer stärkeren Reaktion bei etwa 59 kDa und einer schwachen Reaktion bei etwa 45 kDa ergebend - exakt mit den für die cytoplasmatische Fraktion bestimmten reaktiven Banden überein (vergleiche Abb. 66D und F). Um zu bestimmen, welche der drei beobachteten Proteine dem Pas_{EDL933} entsprach, wurde auch die Δpas_{EDL933} -Mutante fraktioniert und die Fraktionen der inneren Membran sowie des Cytoplasmas wurden einer Western Blot Analyse unterzogen. Hierbei ergab sich, dass alle drei mit AS-anti-Pas_{EDL933} reagierenden Banden nicht in EHEC EDL933 Δpas , sondern nur im Wildtyp-Stamm zu detektieren waren (s. Abb. 66G und H, vergl. Abb. 66D und F).

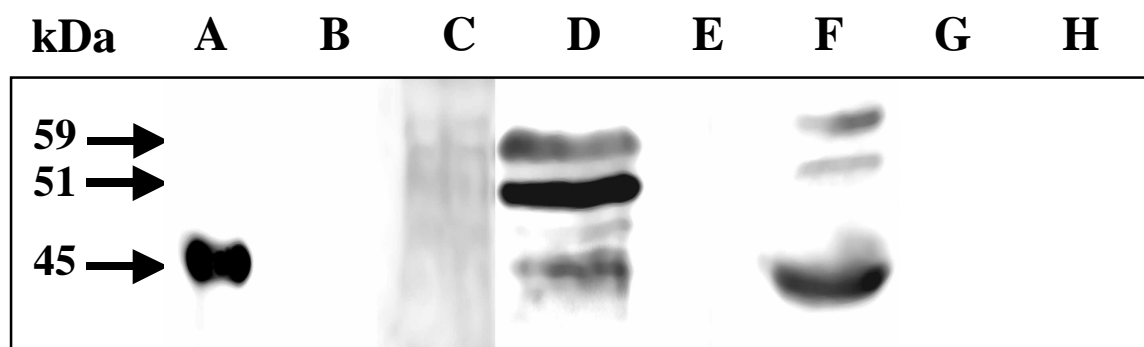


Abb. 66: Sub zelluläre Lokalisation des Pas_{EDL933} Proteins. Bakterielle Kulturen von EHEC EDL933 (B-F) und EHEC EDL933 Δpas (G und H) wurden fraktioniert, und die Proteinextrakte wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt (0,6 µg des aufgereinigten Pas_{EDL933} in A, jeweils 30 µg Proteine in den Spuren B-H) und in einem Immunoblot mit Hilfe von mAb-anti-Pas_{EDL933} analysiert, um die Topologie des *pas*_{EDL933} kodierten Produktes zu bestimmen. (A) Aufgereinigtes His'-Pas_{EDL933}; EHEC EDL933, (B) sekretierte Proteine, (C) Fraktion der äußeren Membran, (D) Fraktion der inneren Membran, (E) periplasmatische Fraktion, (F) cytoplasmatische

Fraktion; EHEC EDL933 Δpas , (G) Fraktion der inneren Membran, (H) cytoplasmatische Fraktion. Die Molekulargewichte der Hauptbanden sind durch Pfeile hervorgehoben.

Daraus ließ sich schließen, dass alle drei Banden dem Protein Pas_{EDL933} zuzuschreiben waren oder dass es Proteine gab, die mit dem Pas_{EDL933} spezifischen Antiserum reagierten und gleichzeitig in ihrer Expression von der Expression von Pas_{EDL933} abhängig waren - was nahezu ausgeschlossen werden konnte. Schließlich bestand noch die Möglichkeit, dass sich Pas_{EDL933} mit anderen Proteinen beispielsweise kovalent zu Heteromeren zusammenschloß und diese in der Western Blot Analyse detektierbar waren. Daher wurden die betreffenden Fraktionen für 30 min statt routinemäßig 5 min im SDS-Ladepuffer gekocht oder es erfolgte die Behandlung mit Iodacetamid. Aber das beobachtete Bandenmuster im Immunoblot blieb erhalten, wodurch die Bildung von Heteromeren oder intramolekularen Disulfidbrücken, die zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität von Pas_{EDL933} geführt hätten, ausgeschlossen wurde (nicht gezeigt).

Die Detektion zweier Banden mit geringerer Laufweite impliziert, dass Pas_{EDL933} auch posttranslational durch Phosphorylierung oder Acetylierung modifiziert werden könnte. Nach dem Versuche einer Dephosphorylierung der Fraktion der inneren Membran mittels Phosphatase für 2 h bei 37°C änderte sich die beobachtete elektrophoretische Mobilität der drei Banden nicht. Ebenso bewirkte die Vorbehandlung der Probe mit 1 M Hydroxylamin, pH 10 keine Veränderung des Bandenmusters. Somit konnte auch die Modifikation von Pas_{EDL933} durch Esther- oder Thioesterbindungen, die gegenüber Hydroxylamin labil sind (Grand, 1989), ausgeschlossen werden. Sollten dennoch Fettsäuren an Pas_{EDL933} gekoppelt werden, so sicherlich über Hydroxylamin-stabile Bindungen wie Amid-Verbindungen, wobei Myristylierungen am häufigsten vorkommen. Tatsächlich zeigte die Aminosäuresequenz von Pas_{EDL933} bei einer Motivsuche (Appel et al. 1994) sieben vorhergesagte Myristylierungsstellen: G₁₂-R₁₇, G₂₉-D₃₄, G₁₂₇-L₁₃₂, G₁₃₄-Y₁₃₉, G₂₃₄-F₂₃₉, G₃₆₇-I₃₇₂ und G₃₉₀-R₃₉₅). Andere bakterielle Permeasen enthalten mitunter eine große Zahl annotierter Myristylierungsstellen: EscD aus EPEC E2348/69 (8), Haemin Permease HmuU aus *Yersinia enterocolitica* und *Y. pestis* (10), Chlorid/Dicitrat-Transportsystem Permease CbrC aus *Erwinia chrysanthemi* (11) oder Eisenchrom-Transportsystem Permease aus *E. coli* (14). Der Nachweis einer Myristylierung eines Proteins war im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar.

7.8. Pas_{EDL933}-Protein-Bindungsverhalten

Es ist für andere Proteine, wie z.B. SecA aus *E. coli* (Economou und Wickner, 1994), nachgewiesen worden, dass der von ihnen bewirkte Transport von Zielproteinen mit einem alternierenden Zyklus von Insertion in die innere Membran und anschließender Rückverlagerung in das Cytoplasma verbunden ist. Hierbei sind die modifizierten Formen solcher Transportproteine durch ihre veränderte elektrophoretische Mobilität nachweisbar. Aufgrund der determinierten Rolle von Pas_{EDL933} in der Sekretion von Esp Proteinen und wegen der Lokalisation einer möglicherweise modifizierten Form von Pas in der inneren Membran wurde das Bindungsverhalten von Pas_{EDL933} an die sekretierten Proteine untersucht. Da His'-Pas_{EDL933} unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt worden war, wurden parallel zum Bindungsverhalten des aufgereinigten Fusionsproteins auch die Fraktionen des Cytoplasmas

(Hauptbande 45 kDa) und der inneren Membran (Hauptbande 51 kDa) analysiert. Hierfür wurden Streifen der elektrophoretisch aufgetrennten und immobilisierten sekretierten Proteine aus EHEC EDL933 mit dem aufgereinigten Protein oder der entsprechenden Fraktion inkubiert, gewaschen, und Pas_{EDL933} wurde durch das spezifische Antiserum detektiert (s. Abb. 67A-C). Die Anwesenheit der sekretierten Proteine auf den Immunoblotstreifen wurde durch die parallele Detektion der einzelnen Proteine EspA, EspB, EspD und EspE mittels spezifischer monoklonaler Maus-Antikörper nachgewiesen (s. Abb. 67D-G). Pas_{EDL933} bindet nach den Ergebnissen dieser Untersuchung an den Intimin-Rezeptor EspE, und zwar sowohl in der Fusionsproteinalsauch in der cytoplasmatischen Form (s. Abb. 67A und B). Die Fraktion der inneren Membran hingegen konnte die Bindung von Pas_{EDL933} an EspE nicht vermitteln (s. Abb. 67C). Aufgereinigtes His'-Pas_{EDL933} zeigte in diesem Versuch auch die Bindung an ein ad dato unbekanntes sekretiertes Protein einer Größe von ungefähr 53 kDa sowie eine schwache Bindung an ein Protein der elektrophoretischen Mobilität von EspB_{EDL933} (s. Abb. 67A). Aus den Bindungsstudien mit den Fraktionen (Abb. 67B und C) wurde ersichtlich, dass die in 7.6.2. erwähnte unspezifische Reaktivität nicht durch EspB_{EDL933} erzeugt worden ist, so dass es sich bei dem Ergebnis der Protein-Bindungsstudie tatsächlich um EspB_{EDL933} handeln könnte.

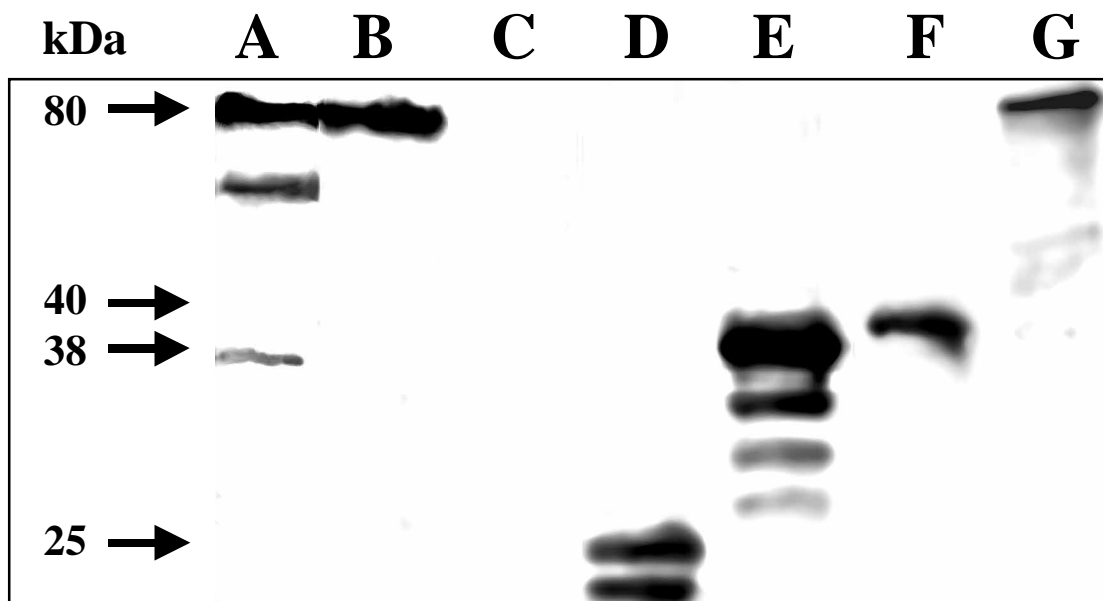


Abb. 67: Bindung von Pas_{EDL933} an sekretierte Proteine aus EHEC EDL933. Kulturüberstände von EHEC EDL933 wurden konzentriert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese wurde in Streifen geschnitten und mit aufgereinigtem Pas_{EDL933} (A), der Pas_{EDL933} enthaltenden cytoplasmatischen Fraktion (B) oder der Fraktion der inneren Membran (C) aus EHEC EDL933 inkubiert. Gebundenes Pas_{EDL933} wurde durch Immunoblotting mit Hilfe von AS-anti-Pas_{EDL933} detektiert. Die Lokalisation von EspA_{EDL933} (D), EspB_{EDL933} (E), EspD_{EDL933} (F) und EspE_{EDL933} (G) wurde in parallel mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern behandelten Membranstreifen bestimmt. Die molekularen Gewichte der Hauptbanden sind durch Pfeile angezeigt.

Pas wurde als essentielle Komponente des Typ III Sekretionssystems von EHEC identifiziert. Der Verlust von *pas* führte zu dem Verlust der Sekretion infektiöser Proteine. Das Auftreten modifizierter Formen von Pas in der inneren Membran könnte aus Myristylierung des Proteins resultieren, was die Lokalisation von Pas in der inneren Membran verstärken würde. Ob

Pas in einem alternierenden Zyklus zwischen Cytoplasma und Membran die Sekretion von Proteinen vermittelt, oder ob Pas beispielsweise eine stabilisierende Funktion für den Typ III Sekretionsapparat einnimmt, bleibt weiterhin zu klären.

8. Bindungsstudien mit Latex Beads

Latex Beads sind inert und binden nicht an Epithelzellen. Werden jedoch Proteine auf die Oberfläche gekoppelt, die eine adhäsive Eigenschaft für eukaryontische Zellen besitzen oder die einen Invasionsmechanismus auslösen, dann lässt sich die Bindung bzw. Invasion der Protein-gekoppelten Latex Beads mit Hilfe der Immunfluoreszenz- oder Elektronenmikroskopie nachweisen.

Für EHEC muss es initiale Bindungen geben, die noch vor der engen Bindung mittels Intimin eine Interaktion zwischen Bakterium und Zelle ermöglichen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass EHEC EDL933 und STEC 413.89-1 EspA-Filamente bildeten, die eine während der Infektion frühe Verbindung der Bakterien zur eukaryontischen Zelle ermöglichte (s. 4.). Zudem war gezeigt worden, dass das Typ III Sekretionssystem und sukzessive die sekretierten Proteine wahrscheinlich eine solche Initialbindung vermitteln, da eine *pas*-Mutante von EHEC EDL933 überhaupt nicht adhärierte (s. 7.). Bereits das Fehlen von EspA und damit das Fehlen der EspA-Filamente genügt, um die Adhärenz von EHEC vollständig einzuschränken (s. 4.). Nach diesen Befunden sollten eine oder mehrere Komponenten der Lage sein, einen initialen Kontakt der Bakterien zur Wirtszelle zu vermitteln. Ob EspA_{EDL933} in der Lage war, per se an die Wirtszelle zu binden, oder ob diese Anhaftung möglicherweise durch andere dieser Arbeit zugängliche Proteine erfolgte, sollte durch die Kopplung der aufgereinigten Proteine an Latex Beads und anschließenden Infektionsversuche geklärt werden.

8.1. Überexpression und Aufreinigung von Esp-Proteinen für die Kopplung an Latex Beads

Die Aufreinigungen der Proteine EspB_{EDL933} und SepL_{EDL933} sind bereits oben im Rahmen von Untersuchungen zur Porenbildung (s. 2.2.), zu Protein-Interaktionen sowie zur DNA-Bindung (s. 6.7.1.) beschrieben worden. Der Versuch der Überexpression von EspD_{EDL933} in analoger Weise zu den anderen His'-Fusionsproteinen hatte zu keinem Erfolg geführt. Ein möglicher Grund liegt in der potentiellen Toxizität des Proteins für den Expressionsstamm *E. coli* M15[pREP4]. Auch der Versuch einer Klonierung von *espD*_{EDL933} in den Expressionsvektor pQE30 durch die Selektion auf LB-Platten mit Antibiotika unter dem Zusatz von 2% (w/v) Glucose, was die Expression des P_{lac}-Promotors gekoppelten Fusionsgens zusätzlich reprimieren sollte, führte nicht zum Erfolg. Ähnliche Probleme zeigten sich im Versuch der Überexpression von *espD*_{STEC413.89-1} mittels GST-Fusion (mdl. Mitteilung F. Ebel). Auch für YopB, dem Homologon aus *Yersinia*, wurde berichtet, dass die Überexpression des Gens für einen *E. coli* K-12-Stamm toxisch war (Neyt und Cornelis, 1999).

Die Überexpression von EspA_{EDL933} erfolgte wie für die anderen Proteine im QIAexpressionist-System (Qiagen). Das *espA*_{EDL933}-Gen wurde mit den Primern ANK14 und ANK15 amplifiziert und in pCR2.1 ligiert (AKSK256). Nach Bestätigung der korrekten Sequenz durch Sequenzierung wurde *espA*_{EDL933} aus pCR2.1 durch *Bam*HI/*Kpn*I-Verdau ausgeschnitten und in

den Überexpressionsvektor pQE30 ligiert (pANK203). Die Anzucht des rekombinanten Fusionsproduktes His'-EspA_{EDL933} erfolgte im *E. coli*-Stamm M15[pREP4]. Vorversuche zur Überexpression ergaben, dass His'-EspA_{EDL933} in der löslichen Cytoplasma-Fraktion des überexprimierenden Stammes vorlag. Damit konnte das Fusionsprotein auf native Weise aufgereinigt werden (s. Abb. 68). Die Überexpression und Aufreinigung erfolgte im 500 ml Maßstab. Die Elution erfolgte in einem Stufengradienten bei 0,2 M Imidazol.

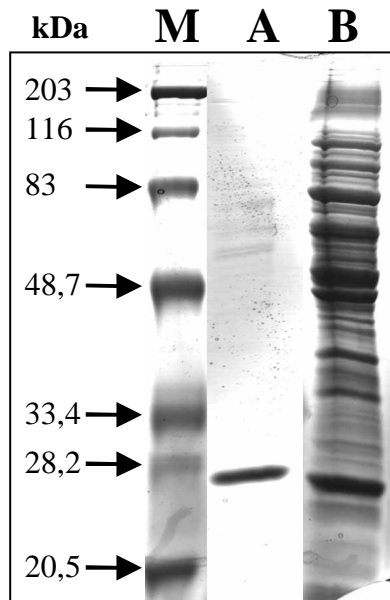


Abb. 68: Überexpression und Aufreinigung des His'-EspA_{EDL933} Fusionsproduktes. *espA*_{EDL933} wurde in den Überexpressionsvektor pQE30 kloniert und als His'-EspA_{EDL933} Fusionsprodukt überexprimiert. Die Aufreinigung erfolgte wie in 8.1. beschrieben. Aliquots wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. (M) Molekularer Standard, die Pfeile indizieren die angegebenen Molekulargewichte; (A) aufgereinigtes His'-EspA_{EDL933} Fusionsprodukt nach Dialyse gegen PBS; (B) Rohextrakt der überexprimierten Kultur.

8.2. Interaktionen von HeLa-Zellen mit gekoppelten Latex Beads

Die einfache Kopplung von Proteinen an Latex Beads (polystyrene, sulfate modified, fluorescent, Sigma L-0403) erfolgte durch die Inkubation der Proteinlösung mit 50 µl gewaschenen Latex Beads über Nacht und die Aufnahme in 200 µl sterilem PBS nach mehrmaligem Waschen. Es erfolgte die Kopplung von EspA_{EDL933}, EspB_{EDL933}, SepL_{EDL933} sowie die Kopplung eines Gemisches der drei genannten Proteine. Als Kontrolle wurden BSA gekoppelte Latex Beads hergestellt. Die Kopplungseffizienz wurde anschließend mit Hilfe des FACS (Fluoreszenz-Aktivierter Zell-Sortierer) analysiert (s. Abb. 69).

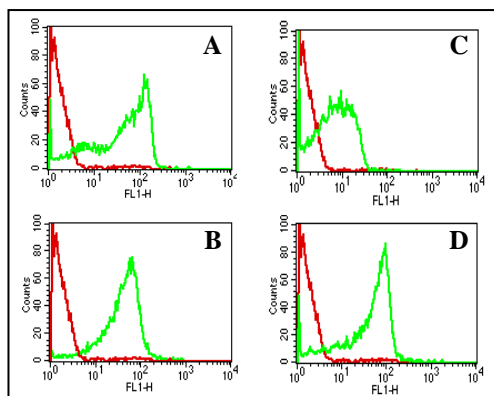


Abb. 69: Bestimmung der Kopplungseffizienz aufgereinigter Proteine an Latex Beads. Die überexprimierten und aufgereinigten Proteine EspA (A), EspB (B) und SepL (C) sowie ein Gemisch dieser Proteine (D) wurden über Nacht mit Latex Beads inkubiert und anschließend mehrfach mit PBS gewaschen. Die Effizienz der Kopplung der Proteine an die Beads (grüne Linie) wurde mit Hilfe eines FACS analysiert, wobei ungekoppelte Beads als Standard verglichen wurden (rote Linie).

Gekoppelte Latex Beads wurden zu jeweils 50 µl auf die in 24 well-Plates angezogenen HeLa-Zellen gegeben und für 3 h inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig gewaschen, um eventuelle schwache Bindungen nicht zu stören. Die Analyse der Interaktion mit gekoppelten Latex Beads an HeLa-Zellen erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie. In keiner der analysierten Proben konnte eine Anhaftung der Protein-gekoppelten Latex Beads an die eukaryontischen Zellen beobachtet werden, die signifikant höher war als die der BSA-gekoppelten Latex Beads, die als Kontrolle eingesetzt wurden.

9. Transkriptionelle Organisation von IR_{EDL933}

Die Expression von Virulenzfaktoren pathogener Mikroorganismen unterliegt oft einer strikten Kontrolle, um einen unnötigen Energieaufwand oder weiterreichende Komplikationen während des Wachstums außerhalb des Wirtes bzw. in entfernt vom Infektionslocus situierten Nischen zu vermeiden (Akerley et al. 1995). Zudem war gezeigt worden, dass EPEC bei Kontakt mit eukaryontischen Zellen eine *denovo* Biosynthese sekretierter Proteine durchführte, die für die erfolgreiche Besiedlung des Wirtes notwendig war (Rosnshine et al. 1996). Der Infektionsprozess schließlich kann in mehrere Schritte untergliedert werden, in denen die Expression der notwendigen Faktoren an- oder abgeschaltet werden können. So z.B. wird die Expression von Intimin nach erfolgreicher enger Adhäsion von EPEC an HeLa-Zellen herunter reguliert (Knutton et al. 1997), oder die für die Infektion durch EPEC und STEC notwendigen *surface appendages*, die das sekretierte und bei Zellkontakt *de novo* synthetisierte EspA enthalten, erfahren ebenfalls eine 'Abschaltung', verdeutlicht durch das Schwinden nachweisbarer EspA-Filamente bei adhärenenten Bakterien (Knutton et al. 1998; Ebe et al. 1998).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Nukleotidsequenz zwischen *eaeA* und einschließlich *espB* aus EHEC EDL933 für fünf ORFs kodiert. Der erste ORF *pas*_{EDL933} liegt einzeln auf dem komplementären DNA-Strang downstream von *eaeA* und wird vermutlich monocistronisch transkribiert (s. 7.1.). Die anderen vier ORFs kodieren für ein regulatorisches Protein SepL_{EDL933}, dessen Lokalisation im Cytoplasma, in der äußeren Membran und in der inneren Membran ist, sowie für die drei über das Typ III Sekretionssystem sekretierten Proteine EspA_{EDL933}, EspD_{EDL933} und EspB_{EDL933}. Die Abstände zwischen den Genen *sepL*_{EDL933}-*espA*_{EDL933}-*espD*_{EDL933}-*espB*_{EDL933} betragen 58 bp - 12 bp - 20 bp. Somit war eine gemeinsame Transkription dieser vier ORFs denkbar. Um die Transkriptionseinheiten der einzelnen Gene zu bestimmen, wurden RNA-Analysen - basierend auf den für die Sekretion der Esp Proteine nachgewiesenen induktiven Bedingungen in Zellkulturmedium mit HEPES - durchgeführt. Das determinierte *esp*-Operon wurde im weiteren Verlauf mittels β-Galaktosidase-Fusionen auf induktive Bedingungen getestet.

9.1. Bestimmung der Transkriptionseinheiten mittels Northern Blot

Für die Bestimmung der Größentranskriptioneller Einheiten in der IR_{EDL933} wurde durch PCR-Amplifikation Gen-interner Nukleotidsequenzen und anschließender radioaktiver Markierung

mit [α - 32 P]dCTP spezifische Sonden für die Detektion der *pas*_{EDL933}, *sepL*_{EDL933}, *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} oder *espB*_{EDL933} enthaltenden mRNA generiert (s. Abb. 70).

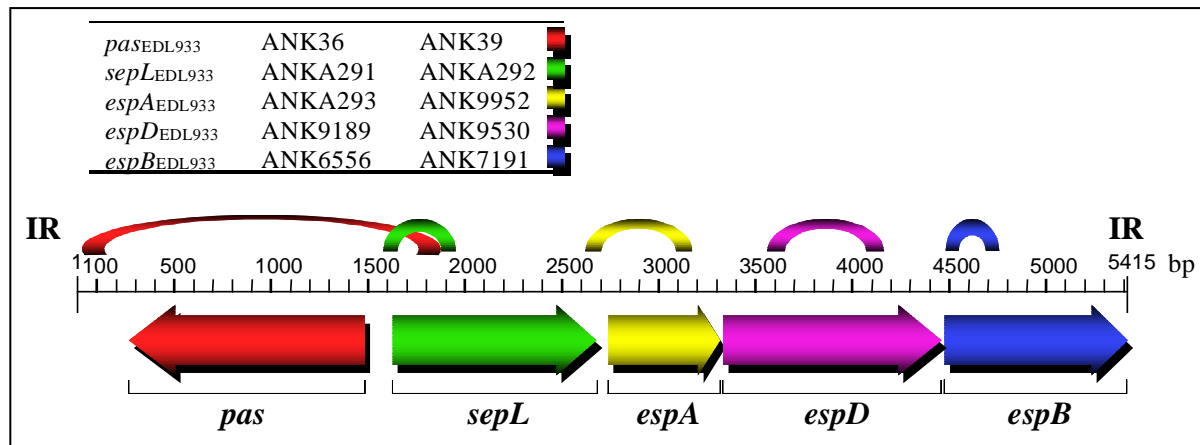


Abb. 70: Schematische Darstellung der durch PCR-Amplifikation generierten DNA-Sonden. Die mittels k-PCR amplifizierten Bereiche aus EHEC EDL933 sind oberhalb der Skalierung von IR_{EDL933} in den jeweiligen ORFs entsprechenden Farben eingezeichnet. Die tabellarische Legende gibt die in der jeweiligen k-PCR verwendeten Primerpaare und den mit dem PCR-Produkt detektierbaren ORF an.

Die Induktion der bakteriellen Kultur zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurde wie für die Gewinnung sekretierter Proteine durchgeführt (s. II.7.4.), um zumindest eine effektive Expression von *espA*, *espD* und *espB* zu gewährleisten. Parallel wurden die Bakterien bei 37°C in LB-Medium angezogen, da die Bedingungen für die Expression der Gene *pas*_{EDL933} und *sepL*_{EDL933} nicht bekannt waren.

Für die Sonden der Gene *pas*_{EDL933} und *sepL*_{EDL933} wurden keine Signale in der Northern Blot Analyse erhalten, was ihre Expression bzw. die Intensität ihrer Expression unter den angewandten Bedingungen in Frage stellte. Möglich war ebenso das Vorliegen relativ instabiler mRNAs, das zur Verfehlung ihrer Detektion führte. Die Sonden für die Gene der sekretierten Proteine hybridisierten in der Northern Blot Analyse ausschließlich mit einem Transkript einer Größe von etwa 2,8 kb (s. Abb. 70). Diese Größe entspricht der Länge einer Nukleotidsequenz, die sowohl die kodierenden Bereiche der drei Gene *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} - vom Startcodon von *espA*_{EDL933} bis zum Stopcodon von *espB*_{EDL933} 2675 bp - sowie zusätzlich ± 100 bp enthält. Ein Transkript dieser Länge, das die Gene der drei sekretierten Proteine beinhaltet, begründet, dass sich *sepL*_{EDL933} nicht in der gleichen Operator-Einheit befindet, was durch ein fehlendes Signal der *sepL*_{EDL933}-Sonde unterstützt wird. Zudem kann hierdurch die Möglichkeit einer 5'-Prozessierung eines potentiellen größeren Transkriptes ausgeschlossen werden. Die Kodierung des downstream von *espB* lokalisierten ORFs L0019 auf dieser Operator-Einheit konnte wegen einer Länge von 408 bp ausgeschlossen werden. Die *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} enthaltende Operator-Einheit wurde als *esp*-Operon bezeichnet.

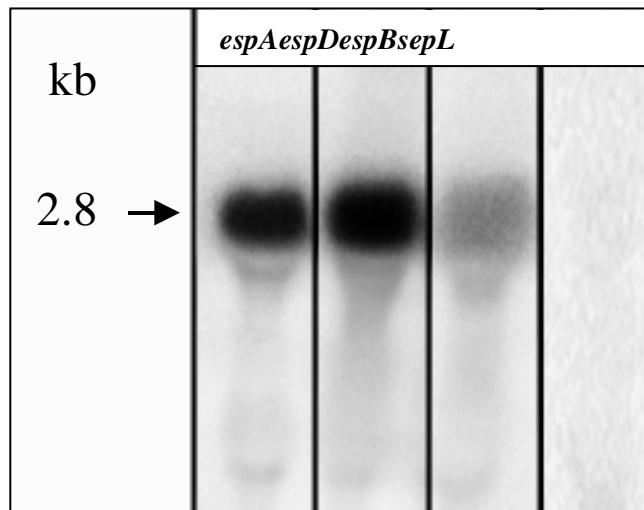


Abb. 71: Northern Blot Analyse des *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} enthaltenden mRNA Transkripts. Gesamt-RNA aus einer 'aktivierten' Kultur von EHEC EDL933 wurde in einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933}, *espB*_{EDL933} und *sepL*_{EDL933} spezifischen DNA-Sonden hybridisiert. Das detektierte mRNA Transkript für alle Sonden bis auf *sepL*_{EDL933} besaß eine ungefähre Größe von 2,8 kb (Pfeil). Für *sepL*_{EDL933} hingegen konnte kein mRNA Transkript zugeordnet werden.

9.2. Bestimmung des Transkriptionsstarts des *esp*-Operons

Während *pas*_{EDL933} und *sepL*_{EDL933} vermutlich singulär transkribiert werden, musste der Transkriptionsstart des polycistronischen *esp*-Operons mit etwa 100 bp unmittelbar vor dem Startcodon von *espA*_{EDL933} liegen. Zur Bestimmung der genauen Startpunkte der Transkription wurden zunächst unter nicht-radioaktiven Bedingungen 5'-RACE Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse hieraus wurden mit Hilfe der Primer Extension Analyse bestätigt bzw. konkretisiert.

9.2.1. 5'-RACE

mRNA wurde wie in 9.1. aus 'aktivierten' Bakterien präpariert, um mittels 5'-RACE-Experimente die Transkriptionsstartpunkte der Gene aus IR_{EDL933} zu bestimmen. Die verwendeten Primer und deren Lokalisation innerhalb der IR_{EDL933} in Bezug auf das erste Nukleotid des respektiven Startcodons sind in Tab. 16 angegeben.

Tab. 16: Verwendete Primer für 5'-RACE

Gen	1. Primer	2. Primer	bp bis Startcodon
<i>pas</i>	ANK4	ANK5	385
<i>sepL</i>	ANK18	ANK19	514
<i>espA</i>	ANK9952	ANK9953	318
<i>espD</i>	ANK8	ANK9	346
<i>espB</i>	ANK9954	ANK9955	452

Die resultierenden PCR-Produkte wurden in pCR2.1 ligiert, kloniert und die Plasmide mehrerer Klone eines RACE-Ansatzes wurden sequenziert. Für das RACE-Experiment mit spezifischen Primern für *sepL*_{EDL933} wurde kein PCR-Produkt erhalten, das auf die Amplifikation eines möglichen Transkriptionsstarts hindeutete (das PCR-Produkt in Abb. 72, Spur 2 kann wegen seiner Größe von etwas über 400 bp und den eingesetzten Primern nur unspezifisch sein). Die RACE-Analyse mit *pas*_{EDL933} spezifischen Primern resultierte in einer schwachen Amplifikation

eines knapp unter 500 bp großen Fragmentes, wodurch für den Transkriptionsstart von ca. 100 bp upstream des Startcodons festgelegt wurden.

*pas*_{EDL933}

Der Versuch der PCR-Amplifikation von cDNA in der RACE-Analyse mittels spezifischer Primer ergab ein sehr schwaches PCR-Produkt bei etwa 2,3 kb, was eventuell auf die Größe des zu erwartenden Transkripts (s. 9.1.) zurückzuführen ist, allerdings eine für das *esp*-Operon erwartete Größe darstellt. Die 5'-RACE-Experimente mit Hilfe der Primer für *espA*_{EDL933} und *espD*_{EDL933} resultierten in den erwarteten Größen der PCR-Produkte von etwa 500 bp und über 1 kb (s. Abb. 72).

*espB*_{EDL933}

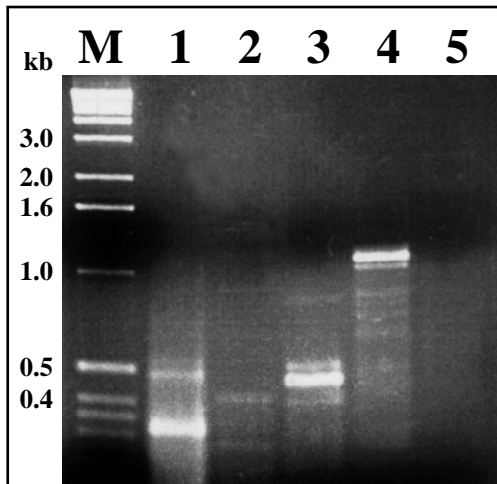


Abb. 72: PCR-Produkte aus dem für *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} spezifischen 5'-RACE Experiment. Die für die Northern Blot Analyse isolierte Gesamt-RNA wurde für das 5'-RACE Experiment eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Abb. 70 aufgeführt. 1, *pas*_{EDL933}; 2, *sepL*_{EDL933}; 3, *espA*_{EDL933}; 4, *espD*_{EDL933}; 5, *espB*_{EDL933}.

Die Sequenzierung von Klonen aus den 5'-RACE-Experimenten für *espA*_{EDL933} und *espD*_{EDL933} wiesen auf einen potentiellen Startpunkt der Transkription zwischen den Positionen IR₂₆₀₄ und IR₂₆₄₄ (Positionsangaben der IR_{EDL933} nach EMBL acc. no. Y13068) mit einer Häufung der Ergebnisse für die Nukleotidsequenz von IR₂₆₃₆ - IR₂₆₄₄ hin, also zwischen 105-97 bp upstream des Startcodons von *espA*_{EDL933}. Der Erhalt mehrerer Startpunkte konnte ein Indiz der Degeneration der mRNA sein, konnte aber auch auf einen nicht ungewöhnlichen gleitenden Startpunkt der Transkription hinweisen. Die Ergebnisse des RACE Experimentes für *espA*_{EDL933} und *espD*_{EDL933} unterstützten gleichsam das Vorliegen eines *esp*-Operons, von dem *sepL*_{EDL933} ausgeschlossen ist.

9.2.2. Primer Extension Analyse

Um den Startpunkt der Transkription des *esp*-Operons zu bestätigen und evtl. genauer zu bestimmen, wurde eine Primer Extension Analyse durchgeführt. Nach Erkenntnissen aus β -Galaktosidase-Studien am Promotor-Bereich des *esp*-Operons (s. 9.3.) wurden die Bakterien für die Isolierung von Gesamt-RNA in M9-Glucose Medium mit 10 mM bzw. 430 mM NaCl bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie unter II. 10.4.2. beschrieben. Als Hauptstartpunkt der Transkription wurde die Position IR₂₆₄₆ (94 bp upstream vom Startcodon von *espA*_{EDL933}) festgelegt (s. Abb. 73). Weitere schwache Signale wurden für die Positionen IR₂₆₄₄, IR₂₆₃₉ und IR₂₆₃₃ gefunden.

Die Primer Extension Analyse nach Anzucht der Bakterien bei hoher Osmolarität führte zu einem deutlich stärkeren Signal (s. Abb. 73, Spur 2), was die in 9.3. gefundenen Ergebnisse untermauert.

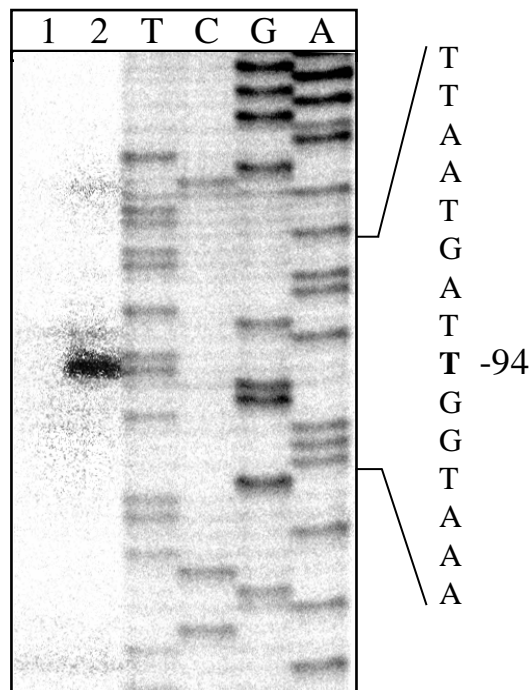


Abb.73: Identifizierung des Transkriptionsstartes des *esp*-Operons durch Primer Extension Analyse. Gesamt-RNA wurde nach Anzucht von EHEC EDL933 in M9-Glucose Medium mit 10mM (1) bzw. 430mM (2) NaCl bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 isoliert. Ein 24 bp Oligonukleotid (PEX56) hybridisierte an die Positionen +3 bis +21 des Bereiches von *espA*_{EDL933} und diente der Generation der Sequenzleiter und für die Primer Extension. Der bestimmte Hauptstartpunkt der Transkription wurde in Relation zum Adenosin des Startcodons von *espA*_{EDL933} (+1) mit -94 bezeichnet. Weitere schwache Signale wurden für die Positionen IR₂₆₄₄, IR₂₆₃₉ und IR₂₆₃₃ gefunden.

Die Sequenzanalyse upstream des festgesetzten Transkriptionsstartes führte zur Aufdeckung eines potentiellen -10 und -35 Bereiches (s. Abb. 74). Die -10 Sequenz weist hierbei Homologien zu den -10 Regionen des *bfpA*-Promotors aus EPEC (Puente et al. 1996), der unter der Regulation durch σ^{70} zuseinschneidet, sowie des *osmE*-Promotors aus *E. coli* (Conter et al. 1997), der σ^S abhängig ist, auf.

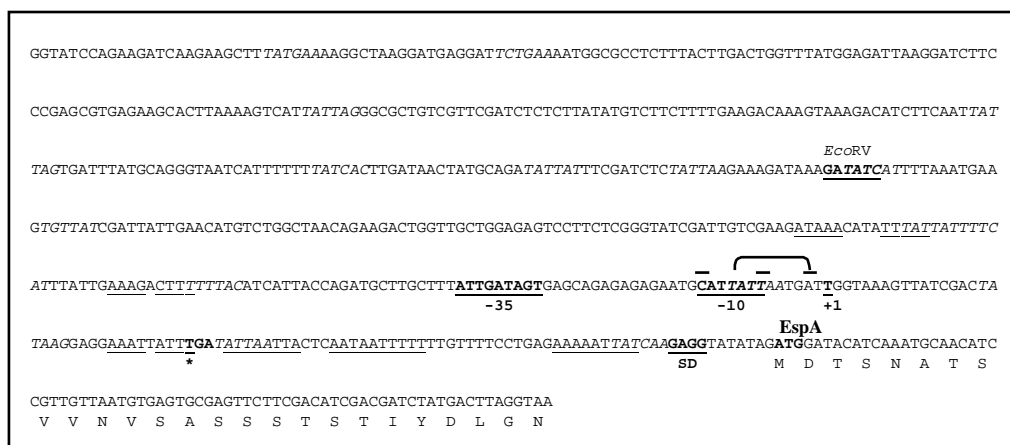


Abb. 74: Promotorbereich des *esp*-Operons. Der Start der Transkription (+1), die putativen -10 und -35 Konsensus Sequenzen, die Shine-Dalgarno Sequenz (SD), die Konsensus-Bindungsssequenz für H-NS (5'-TNTNAN-3', kursiv) und mehrere *inverted* und *direct repeats* (unterstrichen) sind angegeben.

9.3. β -Galaktosidase-Studien

Um die Regulation des *esp*-Operons auf molekular-genetischer Ebene zu analysieren, wurden in Zusammenarbeit mit Fabrizio Beltrametti *lacZ*-Fusionen mit dem Plasmid pUJ9TT konstruiert, die in Bezug auf das Startcodon von *espA*_{EDL933} die Fragmente der Bereiche -577 bis +76 (pUJ3) bzw. -292 bis +76 (pUJ3-285) enthielten. Diese Konstrukte wurden in adäquate Trägersysteme eingebracht und für β -Galaktosidase-Studien eingesetzt.

9.3.1. Expression des *esp*-Operons bei Zellkontakt

Das Typ III Sekretionssystem wird auch als Kontakt-Sekretionssystem bezeichnet (s. Einleitung). Hierzu passte, dass EspA durch diesen Mechanismus sekretiert wurde und die Bildung der EspA-Filamente in der frühen Phase der Infektion angeschaltet und bei einer festen Anhaftung der Bakterien an die eukaryontischen Zellen abgeschaltet zu werden schien (Knutton et al. 1998; Ebel et al. 1998). Ob jedoch EspA nur bei Kontakt mit der Wirtszelle verstärkt ausgeschleust wurde oder ob zu einem solchen Zeitpunkt auf der Ebene der Expression eine Verstärkung folgte, blieb aufzuklären.

HeLa-Zellen wurden mit EHEC EDL933 (pUJ3) infiziert und die β -Galaktosidase-Aktivitäten der adhären und der nicht-adhären Bakterien sowie der in DMEM angezogenen Bakterien nach Abzug der Basis-Aktivität miteinander verglichen (s. Abb. 75). Hieraus ließ sich eindeutig erkennen, dass der unmittelbare Kontakt der Bakterien mit den eukaryontischen Zellen zu einem drastischen Anstieg der Transkription des *esp*-Operons führte (s. Abb. 75, ●), während Bakterien des Überstandes wie auch die Kontrolle in Zellkulturmedium eine konstante Expression aufwiesen (s. Abb. 75, ■ und ▲). Zu den adhären Bakterien waren solche zu rechnen, die sich schwach an die HeLa-Zellen anhafteten. Somit kann spekuliert werden, dass bei dieser Methode eine Selektion erfolgte, die Bakterien des Inokulums mit adhäsiven Strukturen innerhalb der ersten 20 Minuten einer Infektion von den übrigen trennte, da beispielsweise 10% eines Inokulums mit STEC 413.89-1 bereits von vornherein EspA-Filamente enthielten und somit eine Initialbindung eingehen konnten (Ebel et al. 1998). Folgerichtig wäre damit nicht geklärt, ob der Kontakt zur Zelle eine Verstärkung der Expression herbeiführt oder ob die gemessene hohe Aktivität den im Inokulum präsenten Anteil stark exprimierender Bakterien darstellt. Eindeutig erwies sich hingegen der rapide Abfall der Expression nach 2 h Infektion. Dieses Resultat bestätigte den Befund, dass die EspA-Filamente bei engem Kontakt der Bakterien mit der Wirtszelle zurückgebildet wurden (Ebel et al. 1998).

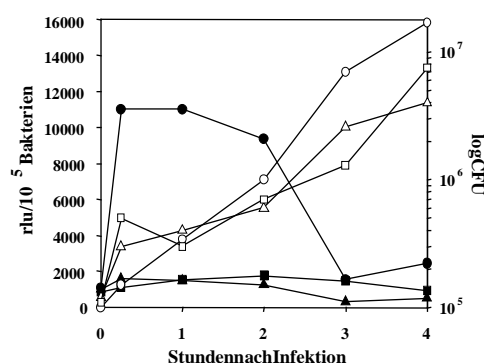


Abb. 75: Expression der β -Galaktosidase durch EHEC EDL933(pUJ3) bei Infektion von HeLa-Zellen. Die Aktivierung der β -Galaktosidase Expression in Bakterien des Kulturüberstandes (■) und adhären Bakterien (●) bei Kontakt mit eukaryontischen Zellen wurde durch Probenahme in verschiedenen Zeitintervallen bestimmt und mit der β -Galaktosidase-Aktivität von EHEC EDL933(pUJ3) in Zellkulturmedium (▲) verglichen. β -Galaktosidase-Aktivitäten werden als *relative light units* (rlu) pro 10^5 Bakterien bezeichnet und repräsentieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen

Experimenten. Offene Symbole indizieren die Anzahl der CFU desentsprechendenZeitintervalls.

9.3.2. EinflussvonKomponentendesMediumsaufdieExpressiondes *esp*-Operons

EHEC überleben die Passage durch den sauren Magen, allerdings wird unter diesen Bedingungen vermutlich das Wachstum herunter reguliert (Beltrametti et al. 1999). Beim Erreichen des Intestinaltraktes des Wirtes finden EHEC hingegen relativ nahrungsreiche Bedingungen in einem physiologischem pH-Wert, in denen ein erneutes Wachstum eintreten kann. EHEC befindet sich nach dieser Vorstellung also bei Erreichen ihrer natürlichen Nische in der frühen logarithmischen Phase. Diese Situation wurde durch das Wachstum von EHEC EDL933(pUJ3) in nahrungsreichem LB-Medium nachgeahmt und dabei in Zeitintervall die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen, um die Expression des *esp*-Operons zu verfolgen. Als Vergleich wurden die Bakterien in M9-Glucose-Medium angezogen. Dabei wurde nur in der frühen logarithmischen Phase bei Wachstum in LB eine erhöhte Expression gemessen (s. Abb. 76a).

Für die Sekretion der Proteine wird die Induktion durch Zellkulturmedium mit HEPES ausgenutzt. Zum Vergleich mit der Expression in LB wurden die Bakterien in DMEM bzw. DMEM mit 100 mM HEPES angezogen, und die β -Galaktosidase-Aktivität wurde gemessen (s. Abb. 76b). Die Zugabe von HEPES resultierte in einer im Vergleich zu LB-Medium zwar etwas schwächeren, doch dafür längeren Induktion des *esp*-Operons (s. Abb. 76B, ●), während im Zellkulturmedium ohne HEPES die β -Galaktosidase-Aktivität auf dem Grundlevel blieb (s. Abb. 76B, ■).

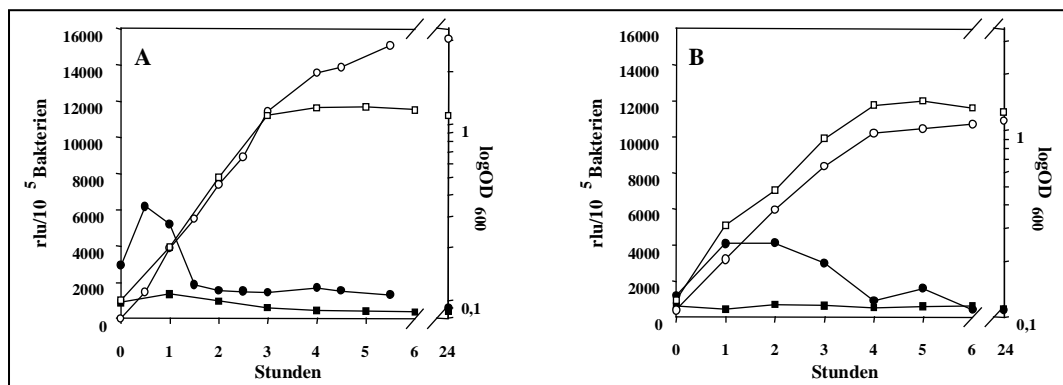


Abb. 76: Induktion der β -Galaktosidase durch verschiedene Medien. EHEC EDL933 wurde wie folgt angezogen: (A) in LB (○) und M9-Glucose (□) Medium; (B) in DMEM (□) oder DMEM mit 100 mM HEPES (○). Die β -Galaktosidase-Aktivitäten aus jeweils drei unabhängigen Experimenten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und als *relative light units* (rlu) pro 10^5 Bakterien bezeichnet. Offene Symbole indizieren die jeweiligen Wachstumsraten (OD₆₀₀).

Viele Spurenelemente induzieren die Expression von Virulenzfaktoren in pathogenen Mikroorganismen (Mekalanos, 1992). Zwar wurde der Einfluss einiger Elemente auf die Sekretion von Proteinen in EPEC und STEC analysiert (Kenny und Finlay, 1995; Ebel et al. 1996), jedoch immer im Vordergrund induzierender Bedingungen (e.g. HEPES und Zellkulturmedium). Hier sollte spezifisch die Induktion der Expression des *esp*-Operons durch

einzelne Spurenelemente untersucht werden. Die Bakterien wurden in M9-Glucose-Medium unter Zugabe der einzelnen Spurenelemente angezogen, und analog zu 9.3.1. wurde die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. NH_4^+ oder Cl^- zeigten keine Auswirkungen auf die Expression des *esp*-Operons (nicht gezeigt). Ca^{2+} hingegen induzierte einen Expressionsanstieg von der frühen bis zur mittleren logarithmischen Phase (s. Abb. 77A), während Mn^{2+} in ähnlichem Ausmaß in der frühen logarithmischen Phase induzierte (s. Abb. 77B). Die generelle Induktion des *esp*-Operons durch bivalente Kationen wurde durch die fehlende Induktion mittels Mg^{2+} ausgeschlossen (nicht gezeigt), und die Zugabe von FeSO_4 oder $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ zeigte, dass weder Eisen in seiner 2- oder 3-wertigen Form noch Nitrat oder Sulfat eine Rolle in der Induktion spielen (nicht gezeigt).

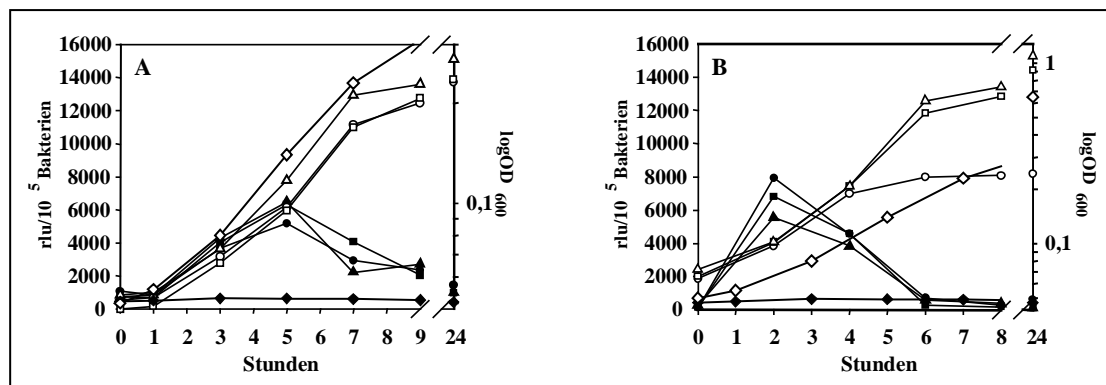


Abb. 77: Induktion der β -Galaktosidase durch verschiedene Spurenelemente. EHEC EDL933 wurde in M9-Glucose Medium mit folgenden Zusätzen angezogen: (A) CaCl_2 (◆, 0 mM; ●, 0,01 mM; ■, 0,1 mM; ▲, 1 mM); (B) MnSO_4 (◆, 0 mM; ●, 0,0033 mM; ■, 0,33 mM; ▲, 3,3 mM). Die β -Galaktosidase-Aktivitäten aus jeweils drei unabhängigen Experimenten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und als relative light units (rlu) pro 10^5 Bakterien bezeichnet. Offene Symbole indizieren die jeweiligen Wachstumsraten (OD_{600}).

9.3.3. Einfluss von Temperatur, pH und Osmolarität auf die Expression des *esp*-Operons

Der Einfluss physikalischer Komponenten auf die Sekretion von Proteinen in EPEC und STEC ist beschrieben worden (Kenny und Finlay, 1995; Ebel et al. 1996), aber der Beitrag dieser Komponenten verlief immer in Kombination mit anderen potentiellen Stimuli (z.B. Komponenten des Kulturmediums).

β -Galaktosidase-Studien von EHEC EDL933 (pUJ3) unter den Bedingungen pH 6, pH 7 oder pH 8 wiesen auf keine Veränderung der Expression des *esp*-Operons hin (nicht gezeigt). Der Einfluss der Temperatur auf die Expression des *esp*-Operons wurde durch die Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität von EHEC EDL933 (pUJ3) in M9-Glucose-Medium (10 mM NaCl) bei 25°C, 37°C und 42°C ermittelt (s. Abb. 78, ●). Keine signifikanten Unterschiede waren hierin zu erkennen. Erhöhte und dagegen die NaCl-Konzentration auf 430 mM, so war eine deutliche Induktion bei 37°C und 42°C ablesbar (s. Abb. 78, ■). Tatsächlich spielt die Osmolarität neben der Temperatur eine wichtige Rolle bei der Expression vieler Virulenzfaktoren in enteropathogenen Bakterien, und erst die Übereinstimmung der optimalen Werte beider Parameter liefert einen guten Hinweis auf die potentiell richtige ökologische Nische für das

Pathogen (Porter und Dorman, 1994; Miller und Mekalanos, 1988; Mekalanos, 1992; Kenny und Finlay, 1995). Um eine Stressantwort auf die erhöhte NaCl-Konzentration auszuschließen, wurde die β -Galaktosidase-Aktivität unter equiosmolaren Sucrose-Konzentrationen gemessen (nicht gezeigt). Die Werte ergaben, dass die Induktion durch NaCl und Sucrose ähnlich hoch waren, woraus geschlossen wurde, dass in der Tat die Osmolarität der Auslöser erhöhter Expression war.

Der Einfluss der Nukleotidsequenz upstream vom Transkriptionsstart wurde mit Hilfe des deletierten Bereiches in pUJ3-285 (s. Abb. 78) untersucht. EHEC EDL933 (pUJ3-285) wurde bei verschiedenen Temperaturen und in 10 mM bzw. 430 mM NaCl angezogen (s. Abb. 78). Die Kombination von hoher Osmolarität mit einer Temperatur von 37°C zeigte dabei einen sehr deutlichen Anstieg der Expression auf (s. Abb. 78).

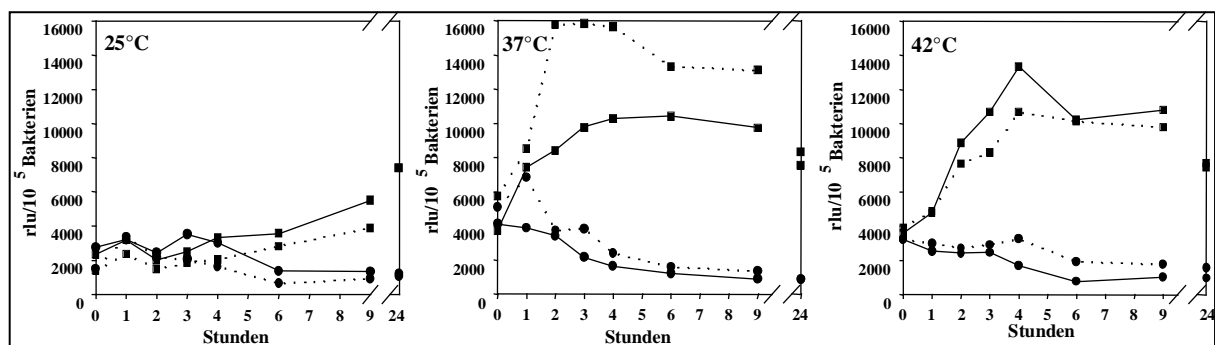


Abb. 78: Aktivierung des *esp*-Operons in Reaktion auf Änderungen von Temperatur und Osmolarität. EHEC EDL933 (pUJ3) (durchgezogene Linien) und EHEC EDL933 (pUJ3-285) (gestrichelte Linien) wurden in Minimalmedium mit 10 mM (●) bzw. 430 mM (■) NaCl bei 25°C, 37°C oder 42°C angezogen. Die jeweiligen β -Galaktosidase-Aktivitäten aus drei unabhängigen Experimenten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und als *relative light units* (rlu) pro 10^5 Bakterien bezeichnet.

9.3.4. Einfluss von σ^S , H-NS und das Megaplasma auf die Expression des *esp*-Operons

Das Auffinden einer potentiellen σ^S -Bindungsstelle (s. 9.2.) führte zur Untersuchung des Einflusses von σ^S auf die Expression des *esp*-Operons. pUJ3 wurde in *E. coli* MC4100 sowie in das σ^S -defekte Derivat *E. coli* RH90 überführt. *E. coli* RH90 (pUJ3) (■) wies im Vergleich zum Wildtyp-Stamm *E. coli* MC4100 (pUJ3) (●) sowohl bei niedriger (gestrichelt) als auch bei hoher (durchgezogen) Osmolarität eine deutlich geringere β -Galaktosidase-Aktivität auf (s. Abb. 79A), woraus eine aktivierende Stellung von σ^S in der Expression des *esp*-Operons herzuleiten ist. Interessanterweise war die β -Galaktosidase-Aktivität in *E. coli* MC4100 (pUJ3) generell 2-4fach niedriger als im vergleichbaren EHEC EDL933 (pUJ3), was die Notwendigkeit zusätzlicher Faktoren vermuten lässt, damit eine volle Expression des *esp*-Operons in EHEC EDL933 zu erreicht werden kann.

Um die Auswirkung des globalen negativen Regulators H-NS auf die Expression des *esp*-Operons zu ermitteln, wurden pUJ3 und pUJ3-285 in *E. coli* GM37 bzw. das *hns*⁻ Derivat *E. coli* GM230 eingeführt. Das Fehlen des deletierten Bereiches in pUJ3-285 führte zu einer 10fachen β -Galaktosidase-Aktivität im *hns*⁺-Stamm *E. coli* GM37 bei hoher Osmolarität (s. Abb. 79B, ■), was auf eine negative Regulation durch H-NS hinweist, wenn der in pUJ3-285 deletierte Bereich

vorhanden ist. Tatsächlich wurden in diesem Bereich mehrere potentielle Bindungsstellen für H-NS detektiert (5'-TNTNAN-3'; Rimsky und Spassky, 1990). Im *hns*⁻-Stamm *E. coli* GM230 waren alle gemessenen β -Galaktosidase-Aktivitäten um das 10-20fache erhöht (s. Abb. 79C). Fehlte also der negative Regulator, so konnte selbst mit der upstream gelegenen Nukleotidsequenz in einem nicht-pathogenen *E. coli*-Stamm eine extreme Expression des *esp*-Operons erzielt werden, woraus geschlossen werden darf, dass H-NS direkt oder indirekt mittels dieser Nukleotidsequenz einen negativen Einfluss auf die Expression von *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} nimmt.

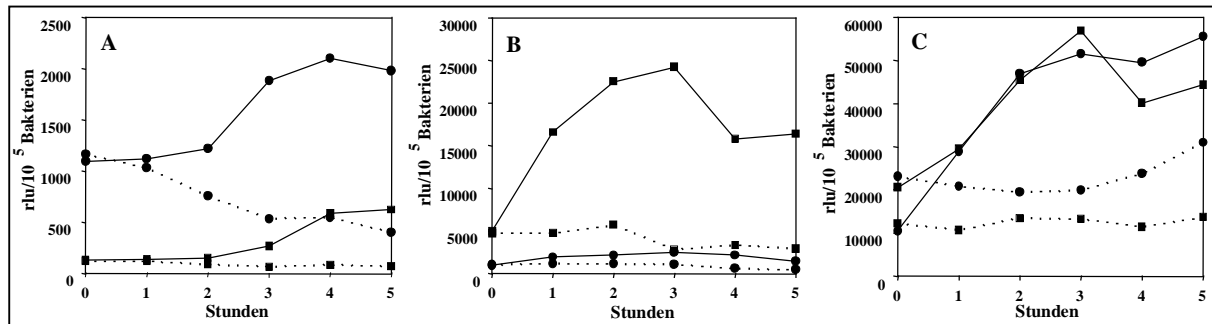
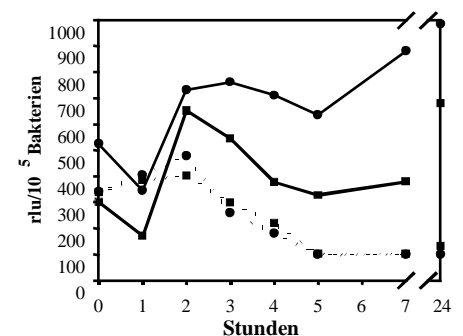


Abb.79: Abhängigkeit der Transkription des *esp*-Operons von σ^S und H-NS. (A) Plasmid pUJ3 wurde in den *E. coli*-Stamm MC4100 (●) und das σ^S -defiziente Derivat RH90 (■) transferiert, und die β -Galaktosidase-Aktivität wurde unter induktiven (430 mM NaCl, durchgezogene Linien) sowie unter nicht-induktiven (10 mM NaCl, gestrichelte Linien) Bedingungen bestimmt. (B und C) Für die Analyse des Einflusses von H-NS wurden pUJ3 (●) sowie pUJ3-285 (■) in den *E. coli*-Stamm GM37 (B) bzw. das *hns* Derivat GM230 (C) transferiert. Die Bakterien wurden in M9-Glucose Medium mit 10 mM (gestrichelte Linien) oder 430 mM (durchgezogene Linien) NaCl angezogen, und die jeweiligen β -Galaktosidase-Aktivitäten aus drei unabhängigen Experimenten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und als *relative light units* (rlu) pro 10^5 Bakterien bezeichnet.

Die Regulation von Virulenzfaktoren im LEE von EPEC wird durch einen Megaplasmid kodierten Aktivator beeinflusst. Dass auf dem Megaplasmid aus STEC ebenfalls regulatorische Elemente kodiert sind, die möglicherweise das *esp*-Operon koordinieren, wurde dadurch bestätigt, dass pUJ3 in dem megaplasmidlosen Derivat STEC 413.89-1/6 in hoher Osmolarität nur eine 2-4fache Aktivierung gegenüber niedriger Osmolarität erfuhr, während die Aktivität des *esp*-Operons in pUJ3 im Wildtypstamm STEC 413.89-18-10facher erhöht wurde.

Abb. 80: Abhängigkeit der Transkription des *esp*-Operons vom Megaplasmid. pUJ3 wurde in STEC 413.89-1 (●) bzw. STEC 413.89-1/6 (■) eingebracht und die Aktivität des *esp*-Operons in M9-Medium mit 10 mM NaCl (gestrichelte Linien) bzw. 430 mM NaCl (durchgezogene Linien) gemessen. Die jeweiligen β -Galaktosidase-Aktivitäten aus drei unabhängigen Experimenten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und als *relative light units* (rlu) pro 10^5 Bakterien bezeichnet.



IV. DISKUSSION

Das Ausmaß der durch EHEC verursachten registrierten Infektionen ist seit der Erstbeschreibung in den frühen 80ern drastisch gestiegen (WHO, 1997b; Riley et al. 1983). Die Heftigkeit ausgelöster Symptome bis hin zu lebensbedrohlichen Komplikationen hat gerade in den letzten Jahren nach Ausbrüchen in Bayern (Bockemuhl et al. 1997), Schottland (Upton und Coia, 1994), Japan (Watanabe et al. 1996) und anderswo auch in der deutschen Öffentlichkeit breites Interesse hervorgerufen. Säuretoleranz und Säureresistenz, enge Anbindung an das epitheliale Gewebe, Ausbildung hochtoxischer Proteine und das Vorkommen von über 200 Serotypen machen EHEC zu einem hochkontagiösen Pathogen, das zunehmend von der Lebensmittelindustrie registriert und gefürchtet wird.

1. *Locus of enterocyte effacement*

Bemerkenswert ist in der Tat der evolutive Aspekt, dass sich durch den Erwerb genetischer Information über horizontalen Transfers sowie durch die Integration eines Phagen aus einem einst harmlosen Kommensale eines der gefährlichsten Pathogene entwickelte. Die chromosomale Insertion einer Pathogenitätsinsel (LEE) im gleichen *hot spot* etabliert die genetische Gemeinsamkeit histopathologischer Prozesse während der Infektion der meisten EHEC- und EPEC-Stämme. Die Konservierung beider LEE aus EHEC und EPEC war jedoch erst nach den Publikationen von Elliott et al. (Elliott et al. 1998; EMBL acc. no. AF022236) und Perna et al. (Perna et al. 1998; EMBL acc. no. AF071027 und AF071034) ersichtlich. Bereits 1995 hatten McDaniel et al. (McDaniel et al. 1995) festgestellt, dass Stämme, die einen A/E-Phänotyp ausprägten, auch den LEE enthielten. Als DNA-Sonden für diese Hybridisierungsstudien waren aus vier Bereichen des LEE verteilte DNA-Subfragmente gewählt worden, und jede der getesteten Stämme mit dem A/E-Phänotyp (19 EPEC, 3 EHEC, RDEC-1, *C. freundii* und 3 *H. alvei*) war positiv für alle vier Sonden, so dass der gesamte LEE für die Ausprägung des A/E notwendig zu sein scheint. Ergänzt wird die Liste der Bakterien mit einem LEE durch DAEC-Stämme, die als A/E-positiv registriert wurden (Beinke et al. 1998). Bakterien, die A/E-negativ waren, reagierten in der Regel nicht mit den Sonden. Nur eine von 79 getesteten Stämmen (darunter *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* und *Vibrio*) reagierte positiv. Dieser Stamm war ein EPEC-Stamm, so dass vermutlich eine in diesem System nicht detektierbare Veränderung der LEE-Sequenz zum Verlust des A/E-Phänotyps führte. Das reziproke Experiment führten McDaniel und Kaper 1997 durch (McDaniel und Kaper, 1997), indem sie den gesamten LEE aus EPEC E2348/69 in einen A/E-negativen *E. coli* K-12-Stamm klonierten. Die übertragene Information genügte, um in einer Infektion mit diesem rekombinanten Stamm das A/E auszulösen. Wegender starken Homologien der beiden LEE-Sequenzen aus EHEC und EPEC wird im Folgenden davon ausgegangen, dass die einzelnen Komponenten vergleichbare Funktionen in EPEC- und EHEC-Infektionen ausführen.

2. Charakterisierung von EspB aus EHEC

Der Ansatzpunkt für die vorliegende Arbeit zur Identifizierung neuer Virulenzgene aus EHEC war die Identifikation und N-terminale Aminosäuresequenzierung des sekretierten EspB-Proteins aus einem STEC-Stamm (Ebel et al. 1996). Es war gefunden worden, dass STEC 413.89-1 in Zellkulturmedium und bei 37°C verstärkt Proteine sekretierte, wohingegen bei niedrigeren Temperaturen in Zellkulturmedium kaum Proteine sekretiert wurden. In LB-Medium zeigte sich überdies ein anderes Sekretionsmuster als in Zellkulturmedium. Während die Sekretion der 104 kDa (PssA/EspP) und 55 kDa (evtl. Flagellin) großen Proteine in Zellkulturmedium reduziert wurden, erhöhte sich die Konzentration der 22 kDa und 25 kDa (beide EspA) sowie 37 kDa (EspB) großen Proteine. Für EPEC waren darüber hinaus ein 39 kDa und ein 40 kDa großes Protein im Kulturüberstand bestimmt worden (Kenny und Finlay, 1995). Alle sekretierten Proteine von EPEC interagierten mit den epithelialen Wirtszellen und konnten während einer Infektion mit EPEC in Triton X-100-löslichen Fraktionen (cytoplasmatische und Membranproteine der Wirtszelle) wiederentdeckt werden (Kenny und Finlay, 1995). Um die Detektion bakterieller Proteine aus intrazellulären Bakterien zu vermeiden, war Cytochalasin D (blockiert die bakterielle Aufnahme; Rosenshine et al. 1992b) zum Infektionsmedium zugegeben worden. Eine EPEC-Mutante im Typ III Sekretionssystem vermittelte dagegen keine Lokalisation dieser bakteriellen Proteine in den eukaryontischen Zellen, so dass die Topologie der Proteine vom Typ III Sekretionssystem abzuhängenschien.

Die Klonierung und Sequenzierung von *espB* aus EHEC EDL933 und STEC 413.89-1 erbrachte die erste molekulare Charakterisierung eines durch STEC-Stämme über das Typ III Sekretionssystem sekretierten Proteins (Ebel et al. 1996). Die Aminosäuresequenzen der beiden STEC-Stämme wiesen keine signifikant höheren Homologien untereinander auf (82% Similarität) als im Vergleich der individuellen Aminosäuresequenzen zu EspB aus EPEC E2348/69 (77% bzw. 82% Similarität). Vergleiche zwischen der LEE-Sequenz aus EPEC E2348/69 und EHEC EDL933 haben gezeigt, dass die Gene, welche für Proteine des Typ III Sekretionssystems kodieren, bis auf eine Ausnahme (*sepZ*, 70,71% Identität) hochkonserviert vorliegen (95,32 - 100% Identität). Im Gegensatz hierzu stehen die Gene für Proteine, die während einer Infektion in den direkten Kontakt mit der Wirtszelle treten: Intimin (*iaeA*, 87,23% Identität), das als Adhäsin an den bakteriellen Rezeptor EspE/Tir (Kenny et al. 1997b; Deibel et al. 1998) sowie an β_1 -Integrine (Frankel et al. 1995; Kenny, 1999) bindet; EspE/Tir (*espE/tir*, 66,48% Identität), der bakterielle und in die Wirtszellmembran translokierte Rezeptor; EspA (*espA*, 84,63% Identität), EspB (*espB*, 74,01% Identität) und EspD (*espD*, 80,36% Identität), sekretierte Proteine, die als putative Effektoren oder als Translokatoren für andere Effektorproteine fungieren. Es gibt nur drei weitere ORFs innerhalb der LEE-Sequenz, deren Identität zwischen EPEC E2348/69 und EHEC EDL933 deutlich geringer ist als die hochkonservierten Gene des Typ III Sekretionssystems. Alle drei ORFs liegen unmittelbar upstream von *espE/tir* und kodieren für unbekannte Proteine (78,06% bzw. 74,70% Identität) bzw. für ein Homologon zu IpgBaus *Shigella* (L0028/orf19, 82,52% Identität), dessen Funktion unbekannt ist (Baudry et al. 1988). Die Variabilität der Gene findet sich gehäuft in dem zum Prophagen 933L (bzw. dem analogen Bereich in EPEC) zugewandten Bereich des LEE. Dieser Bereich unterliegt sicherlich nicht häufigeren Mutationsereignissen als die restliche Sequenz des

LEE. Vielmehr spiegelt sich hierin der Toleranzspielraum der variablen Gene gegenüber Mutationen wider, ohne dass bedeutsame Eigenschaften für die Pathogenität der individuellen Organismen verloren gingen. Es gibt durchaus bedeutende Unterschiede im Infektionsprozess zwischen den verschiedenen Stämmen bzw. Gruppen verschiedener pathogener *E. coli*. Am deutlichsten wird dies im natürlichen Infektionslokal von EPEC und EHEC. Die Variabilität von Intimin ermöglicht hier die Besiedlung zweier verschiedener Regionen des Intestinaltraktes (Dün- bzw. Dickdarm), wie dies durch Transkomplementationsstudien belegt werden konnte (Tzipori et al. 1995). Auch die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen in der Wirtszelle, u.a. des Intimin-R ezeptors Tir, durch EPEC setzt unterschiedliche Akkzente im Verlauf einer Infektion. Lange wurde diese Phosphorylierung als notwendig für den Infektionsprozess betrachtet, ohne dass berücksichtigt wurde, dass viele EHEC-Stämme nicht in der Lage hierzu sind (Rosenshine et al. 1992a; Baldwin et al. 1991). Erst eine EPEC-Mutante machte klar, dass diese Aktivität nicht für die Pathogenität des Organismus notwendig ist (Rabinowitz et al. 1996). EHEC E32511/0 (Serotyp O157) ist ebenfalls in der Lage, eine Tyrosin-Phosphorylierung durchzuführen (eigene Daten, nicht gezeigt) und unterscheidet sich in der Adhäsivität zu HeLa-Zellen von EHEC EDL933 nur insignifikant, was die geringere Rolle der Phosphorylierung im A/E-Prozess unterstreicht.

Ein möglicherweise bedeutender Unterschied zwischen EspB aus STEC und EPEC ist die N-terminale Serin- und Threonin-reiche Sequenz, die an einen Bereich des Internalin A aus *Listeria monocytogenes* erinnert (Donnenberg et al. 1993b) und möglicherweise eine Rolle von EspB in der Internalisation der Bakterien andeutet. Tatsächlich ist diese Sequenz in EspB aus EHEC EDL933 und STEC 413.89-1 nicht so stark konserviert, und dies mag mit der Feststellung korrespondieren, dass die Invasion von EPEC E2348/69 in HeLa-Zellen 10fach höher ist als die von EHEC EDL933 ((McKee und O'Brien, 1995); eigene Daten, nicht gezeigt). Allerdings ist bereits die Adhäsivität von EPEC E2348/69 signifikant höher als die von EHEC EDL933, so dass die größere Invasivität sicherlichehere eine sekundäre Folgeerscheinung darstellt. In der Tat konnten Ismaili et al. (Ismaili et al. 1998) nachweisen, dass ein EHEC-Stamm in einer Koinfektion mit einer Intimin-Mutante von EPEC eine gesteigerte Adhäsion aufwies, was eine gesteigerte Invasion in die Wirtszellen zur Folge hatte. Abe et al. (Abe et al. 1997) berichteten, dass die Verfügbarkeit von *espB* aus EPEC in einem rekombinanten RDEC-1-Stamm zu einer Verstärkung der Invasivität in HeLa-Zellen führte. EspB aus RDEC-1 ist zu 100% identisch mit EspB aus STEC 413.89-1 (SPTREMBL acc. no. 71213), und so ist zu vermuten, dass die Invasivität von STEC 413.89-1 wie möglicherweise auch von anderen STEC-Stämmen durch die Klonierung von *espB* aus EPEC zu verbessern wäre. Ob allerdings EspB eine direkte Rolle im Aufnahmeprozess spielt oder ob EspB als Translokator und/oder potentieller Effektor eine indirekte Beeinflussung der eukaryontischen Wirtszelle (über Signaltransduktionswege) ausübt, bleibt zu klären. Allerdings zeigte sich durch Experimente mit Latex Beads, an denen EspB gekoppelt war, dass EspB allein nicht in der Lage ist, eine Adhäsion an HeLa-Zellen zu vermitteln.

Zwei induktive Bedingungen für eine verstärkte Sekretion des Esp-Proteins aus EHEC EDL933 waren das Wachstum bei einer Temperatur von 37°C und die Verwendung von Zellkulturmedium (Ebe et al. 1996). In LB-Medium war dagegen die Sekretion von EspB aus EHEC EDL933 im Gegensatz zu STEC 413.89-1 durch Western Blot Analyse nicht

nachweisbar, und die Menge an sekretiertem EspB unter induktiven Bedingungen war aus EHEC EDL933 nicht so groß wie bei anderen STEC-Stämmen. Bei den untersuchten sechs STEC-Stämmen sekretierten unter den gegebenen Bedingungen die drei Isolate aus Rindern (STEC 413.89-1, STEC S102-9, STEC CB207) das Protein EspB stärker als die humanen Isolate (EHEC EDL933, EHEC HUS-2, EHEC H-19) (Ebel et al. 1996). Die Sekretion von Virulenzfaktoren führt zu einer starken Immunantwort des Wirtes. So konnten Jarvis und Kaper zeigen, dass Seren aus HUS-Patienten starke Antikörpertiter gegen die sekretierten Proteine aufwiesen (Jarvis und Kaper, 1996). Möglicherweise deutet die schwächere Sekretion von humanpathogenen Stämmen auf eine Adaptation hin, bei der dem Wirtsabwehrmechanismus möglichst wenig Antigene entgegengebracht werden sollen. In die gleiche Überlegung fällt auch der Befund, dass die Expression von Intimin nach der engen Adhäsion von EPEC an die Wirtszelle unterreguliert wird (Knutton et al. 1997). Intimin ist ein stark immunogenes Antigen (Levine et al. 1985), das durch seine Topologie auf der Oberfläche des Bakteriums - in seiner Funktion als Ligand zur Bindung an eukaryontische Zellen - Intimin nach außen exponiert - gut als Zielscheibe der Immunabwehr missbraucht bzw. gebraucht werden könnte. Exponierte Antigene sind in vielen Fällen notwendig, um den Bakterien die Adhäsion (z.B. BFP von EPEC, P-Pili von UPEC) oder die Invasion (z.B. Invasomen von *Salmonella*) zu ermöglichen. So dient die Expression von Flagella außerhalb des Wirtes *Bordetella bronchiseptica* der Motilität, die möglicherweise auch für die Transmission in den Wirt notwendig ist. Aber die Produktion der Flagellen innerhalb des Wirtes kann zu einer für das Bakterium katastrophalen Entwicklung führen, da während der Infektion durch *B. bronchiseptica* eine Antikörper-Reaktion gegen flagellare Proteine erfolgt (Akerley et al. 1995). Auch die Expression und Sekretion von Virulenzfaktoren aus EHEC und EPEC scheint strikt reguliert zu sein (Parsot, 1994; Kenny und Finlay, 1995; Gomez Duarte und Kaper, 1995; Ebel et al. 1996; Beltrametti et al. 1999). Ebel et al. erwähnten, dass es keinen intrazellulären Pool sekretierter Proteine gab, die durch eine Aktivierung des Typ III Sekretionssystems freigesetzt werden könnten, sondern dass folgerichtig die Induktion der Expression sekretierter Proteine unter induktiven Bedingungen erfolgen würde (Ebel et al. 1996). Für EPEC wurde die Anschaltung der (Proteinexpression und) Sekretion unter geeigneten Bedingungen veranschaulicht (Kenny und Finlay, 1995), indem die Sekretion während einer Infektion über einen Zeitraum von 3 h verfolgt wurde. Darin wurde nachgewiesen, dass zunächst EspP (ein Autotransporter), danach EspB, EspD, EspA und ein GAPDH-homologes Protein sekretiert wurden. Insgesamt bietet sich das Bild einer koordinierten Expression eines gesamten Satzes an Virulenzfaktoren, um den notwendigen Einsatz immunogener Proteine auf den entscheidenden Moment der Integration in die richtige ökologische Nische zu beschränken.

Frühere Versuche hatten gezeigt, dass eine Deletionsmutante von *espB* in der engen Adhäsion von EPEC gestört war und keine Aktinakkumulation und Tyrosin-Phosphorylierung in der eukaryontischen Zelle bewirkte (Foubister et al. 1994; Donnenberg et al. 1993b). Sekretiertes EspB wies zudem eine Protease resistente Subpopulation bei Kontakt von EPEC mit Epithelzellen auf (Kenny und Finlay, 1995), was die Theorie der Integration der sekretierten Proteine in die Umgebung der Wirtszelle bestätigte. Eine tatsächliche Funktion von EspB aus EPEC konnte aufgeklärt werden (Wolff et al. 1998; Taylor et al. 1998). Die putative Effektorrolle von EspB nach Translokation in das Cytoplasma der Wirtszelle ist zwar noch nicht

geklärt, aber analog zum homologen Protein YopB aus *Yersinia* wird EspB in die Cytoplasmamembran der Wirtszelle integriert und fungiert - allein oder vielleicht im Verbund mit weiteren Proteinen - als Translokator für sich selbst (EspB) als auch für weitere noch zu identifizierende Effektorproteine. Somit war dieses Protein in den benannten Topologien für die Protease-Versuche von Kenny und Finlay nicht zugänglich. EspB ist notwendig für die cytoskeletale Reorganisation, dient jedoch nicht selbst als Nukleator zur Aktinakkumulation (Taylor et al. 1998), sondern vermittelt wahrscheinlich die Translokation des Intimin-Rezeptors EspE/Tir, woraufhin die enge Anhaftung der Bakterien über Intimin und darauf folgend eine gerichtete Aktinakkumulation ermöglicht wird.

YopB und YopD fungieren als Translokatoren für andere Effektoren aus *Yersinia*, wie z.B. YopE, das die wirtszelleigene Aktinfilamentstruktur zerstört, oder YpkA, eine Serin/Threonin-Kinase, die an die innere Seite der eukaryontischen Cytoplasmamembran dirigiert wird und Signaltransduktionswege interferiert (Cornelis und Wolf-Watz, 1997). Die Bedeutung von YopD in der Translokation von YopE wurde durch die Lokalisation des Effektors YopE bei einer Infektion von HeLa-Zellen mit einer *yopD*-Mutante (Rosqvist et al. 1994) sowie durch die fehlende Translokation eines YopE-Cya-Reporterproteins durch die *yopD*-Mutante in die Wirtszelle (Sory und Cornelis, 1994) aufgezeigt. Die Translokation von YopD in das Cytoplasma von HeLa-Zellen wurde dagegen erst kürzlich beschrieben (Francis und Wolf-Watz, 1998). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass YopD bifunktional neben einer YopB-abhängigen Translokation in das Cytoplasma der Wirtszelle und der beschriebenen Funktion als Translokator für andere Yop-Proteine auch eine regulatorische Rolle in der Expression von Yop-Proteinen spielt. Somit sind interessanterweise auf einem Operon (*lcrGVH-yopBD*) zwei Regulatoren für die Synthese von Yops kodiert. Vergleichbar hierzu scheint es im *sipBCDA*-Operon von *S. typhimurium* wenigstens eine bifunktionelle Komponente zu geben, die sowohl in der Translokation von Proteinen als auch in der Regulation ihrer Expression fungiert (Wood et al. 1996). Auch SipB und SipC werden in das Cytoplasma der Wirtszelle transloziert (Collazo und Galán, 1997), aber eine putative Effektorrolle konnte bislang nicht beschrieben werden.

YopB zeigt gemäß den Analysen von Wolff et al. schwache strukturelle Ähnlichkeiten zu EspB aus EPEC auf (Wolff et al. 1998). Datenbanksuchen mit EspB, die strukturelle Eigenschaften von Proteinen vergleichen, lieferten YopB als erstes vergleichbares Protein. Mit dem GAP-Algorithmus (GCG) dagegen deckte ein Vergleich von EspB aus EHEC EDL933 mit YopB eine Similarität von lediglich 24% auf. Bei Datenbanksuchen mit EspB, die die lineare Aminosäuresequenz vergleichen, wurde YopB nicht annotiert. Vielmehr resultierte eine Suche mit EspD in der Auflistung von YopB, so dass diese beiden Proteine in ihrer Sequenz ähnlicher zueinander sind als EspB und YopB. Dennoch wurde EspB als funktionales Analogon zu YopB deklariert (Wolff et al. 1998). YopB dient wie YopD zur Translokation von Effektoren aus *Yersinia* in die Wirtszelle. Allerdings wird YopB nicht in das Cytoplasma der eukaryontischen Zelle dirigiert, sondern inseriert in die Cytoplasmamembran, wo es in Erythrocyten eine hämolytische Aktivität besitzt (Håkansson et al. 1996b). Dieses Ergebnis läßt auf die mögliche porenbildende Eigenschaft dieses Proteins schließen (Cornelis und Wolf-Watz, 1997).

Die Überexpression von EspB_{EDL933} sollte zur Aufklärung porenbildender Eigenschaften dieses Proteins verwendet werden, um eine analoge Funktion zu YopB in der Translokation von Effektoren aufzuklären und/oder um möglicherweise die Beobachtung erklären zu können, dass

während einer Infektion die transepitheliale elektrische Resistenz von Monolayern abnimmt (Canile et al. 1993). Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Dr. A. Wiese im Forschungszentrum Borstel deuten jedoch keine solche Eigenschaft für EspB_{EDL933} an, was sich eventuell durch das Vorliegen eines unfunktionellen Proteins auf Grund inkorrektter Faltung oder fehlender Modifikation zurückführen ließe (nicht gezeigt). Wahrscheinlicher scheint es jedoch zu sein, dass für die Funktion als Translokator innerhalb der eukaryontischen Membran mindestens ein zweites Protein (zur Ausbildung von Heteromultimeren oder als extrabakterielles Chaperon) notwendig ist, wie dies für YopB und YopD aus *Yersinia* bekannt ist (Neyt und Cornelis, 1999; Cornelis und Wolf-Watz, 1997).

Auch die fehlende Eigenschaft EspB_{EDL933}-gekoppelter Latexbeads, an HeLa-Zellen zu binden, könnten auf die Notwendigkeit weiterer Proteine bzw. Hilfsysteme zur Integration von EspB_{EDL933} in die Cytoplasmamembran hindeuten. Spekuliert wird in diesem Zusammenhang, dass die EspA-Filamente in dem Prozess der Translokation und Integration von EspB grundlegend beteiligt sind (Wolff et al. 1998). Taylor et al. fanden, daß eine *escN*-Mutante von EPEC nicht mehr in der Lage war, EspB in HeLa-Zellen zu translokieren (Taylor et al. 1998) und schlossendaraus, dass das Typ III Sekretionssystem für diese Aktivität notwendig ist. EscN (*sepB*) ist homolog zu YscN aus *Yersinia*, Spa47 aus *Shigella* und SpaL aus *Salmonella* und dient im Typ III Sekretionsmechanismus wahrscheinlich analog zu den genannten Proteinen als ATPase für den Proteinexport (Jarvis et al. 1995). Eine *eeA*-Mutante von EPEC zeigte sich in der Lage, EspB zu translokieren (Taylor et al. 1998), obgleich Intimin für eine höhere Translokationseffizienz benötigt wurde (Wolff et al. 1998). Dies steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass eine Intimin-Mutante den bakteriellen Rezeptor Tir in die Wirtszelle translokieren kann (Rosenshine et al. 1992; Kenny und Finlay, 1997c). Die Translokation von EspB erfolgt also unabhängig von einer engen Adhäsion der Bakterien an die eukaryontische Zelle, aber sie ist abhängig von den sekretierten Proteinen EspA und EspD, da EPEC-Mutationen in *espA* oder *espD* sehr wohl noch zur Sekretion von EspB führten, aber diese Mutanten waren nicht in der Lage, EspB gezielt zu translokieren (Taylor et al. 1998). Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation von EspD in der eukaryontischen Cytoplasmamembran nachgewiesen werden (s.u.), und somit scheint EspD ein guter Kandidat für einen Liganden von EspB zur Ausbildung eines möglichen Heteromultimers zu sein. Analog wurde bereits für YopB und YopD die Bildung eines Komplexes nachgewiesen (Neyt und Cornelis, 1999). YopD wurde zwar als translokiertes Protein im Cytoplasma der Wirtszelle aufgezeigt (Francis und Wolf-Watz, 1998), aber mit Hilfe des Chaperons SycD erfolgt bereits im Cytoplasma des Bakteriums die Ausbildung eines YopB-YopD-Komplexes, der über das Typ III Sekretionssystem ausgeschleust wird (Neyt und Cornelis, 1999). YopD könnte in diesem Sinne als extrabakterielles Chaperon betrachtet werden (Neyt und Cornelis, 1999), oder umgekehrt vermittelt YopB die direkte Translokation von YopD in die Wirtszelle. Chaperone des Typ III Sekretionssystems wurden bis lang für die Vermeidung intrabakterieller Interaktionen sekretierter Proteine untereinander und/oder mit Komponenten des Sekretionssystems verantwortlich gemacht (Ménard et al. 1994; Woestyn et al. 1996). SycD wird wahrscheinlich im Moment der Sekretion vom YopB-YopD-Komplex abgespalten und dient in diesem Modell als spezifische Sekretionshilfe für den fertigen Komplex. Das homologe Chaperon in EPEC, CesD, ist ebenfalls notwendig für die Sekretion der Proteine EspB und EspD, erfährt jedoch im Gegensatz zu SycD

sowie dem Homologen IpgC aus *Shigella* (Ménard et al. 1994) möglicherweise einen alternierenden Zyklus zwischen Cytoplasma und innerer Membran (Wainwright und Kaper, 1998). Sollten EspB und EspD analog zu YopB/YopD einen Komplex bilden, so würden sich die Systeme dennoch neben der Wirkungsweise der spezifischen Chaperone auch in der Topologie der sekretierten Proteine (und damit vielleicht ihren Wirkungsmechanismen) in der Zielzelle unterscheiden.

Im Gegenzug wird Tir in Abhängigkeit von EspB, EspA und EspD translokiert. Die Notwendigkeit von EspB für die Translokation des bakteriellen Intimin-Rezeptors Tir (Taylor et al. 1998) erklärt zumindest die indirekte Rolle von EspB in der Rekrutierung von wirtseigenem Aktin unterhalb adhärenter Bakterien, denn erst die Bindung von Intimin ermöglicht die fokale Akkumulation von Aktin (Taylor et al. 1998).

3. Pas ist eine Komponente des Typ III Sekretionsapparates

Die Klonierung und Sequenzierung von *espB*_{EDL933} erschloß eine sehr schnelle Möglichkeit zur Klonierung des zwischen *eaeA*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} liegenden Bereiches aus EHEC EDL933. Die in diesem Bereich einschließlich *espB*_{EDL933} gefundenen fünf ORFs *pas*_{EDL933}, *sepL*_{EDL933}, *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} (EMBL acc. no. Y13068) wurden erst 1998 durch die Veröffentlichung des LEE_{EDL933} (Perna et al. 1998) vollständig bestätigt. Geringfügige Abweichungen betreffen lediglich synonyme Basenaustausche (Perna et al. 1998). Die zu *pas*_{EDL933} homologe *escD*-Sequenz aus EPEC wurde nach mehrfachen Einträgen in der EMBL-Datenbank mit Sequenzfehlern durch Elliott et al. schließlich doch in der durch die vorliegende Arbeit postulierten Form bestätigt. Die Bezeichnung *pas* entging der Einordnung in eine für EPEC und EHEC vereinheitlichte Nomenklatur (Elliott et al. 1998), die erst nach Einreichung der Veröffentlichung über *pas*_{EDL933} (Kresse et al. 1998) publiziert wurde. Daher wird *escD* aus der LEE-Sequenz von EHEC EDL933 (Perna et al. 1998) in dieser Arbeit als *pas*_{EDL933} geführt. *Pas*_{EDL933} ist eines der stark konservierten Proteine des Typ III Sekretionssystems in STEC und EPEC (Perna et al. 1998; Kresse et al. 1998) und ist absolut notwendig für das Funktionieren dieses Sekretionsapparates. Weder *EspA*_{EDL933}, noch *EspB*_{EDL933}, *EspD*_{EDL933} oder der translokierte Intimin-Rezeptor *EspE*, der unter induzierenden Bedingungen ebenfalls in den Kulturüberstand sekretiert wird, wurden durch eine isogene *pas*-Deletionsmutante von EHEC EDL933 sekretiert. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass *EspE*/Tir nicht nur abhängig vom Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle translokiert wird (Kenny et al. 1997b), sondern tatsächlich direkt über diesen Weg ausgeschleust wird. Kenny et al. hatten spekuliert, dass Tir nicht über dieses Sekretionssystem ausgeschleust wird, da dem sekretierten Protein das N-terminale Methionin fehlte (Kenny et al. 1997b).

Aufgrund der fehlenden Sekretion der Esp-Proteine und somit dem Ausbleiben der Translokation des bakteriellen Intimin-Rezeptors waren sämtliche phänotypischen Eigenschaften des A/E in der *pas*-Mutante in EHEC EDL933 vollständig ausgeschaltet. Selbst die HeLa-Zellen wiesen keine für die EHEC-Infektion charakteristischen Stressfasern auf. Die Expression der normalerweise sekretierten Proteine war nicht gestört, wodurch ein regulatorischer Effekt ausgeschlossen wurde, und die Komplementierbarkeit der Deletionsmutante durch die Expression von *pas*_{EDL933} *intrans* zeigte, dass keine sekundären Effekte wie z.B. Downstream-Effekte aufgetreten waren.

Mit pKSC2 wurde das *pas*-Gen der Komplementationsmutante in hoher Kopienzahl zur Verfügung gestellt. Dass damit lediglich eine partielle Komplementation erreicht wurde, lässt sich möglicherweise durch die erforderliche genaue Titration der Komponenten des Typ III Sekretionssystems erklären, wie dies für *sepZ* aus EPEC sowie für Komponenten des Typ II Sekretionssystems aus *Klebsiella oxytoca* beschrieben worden ist (Rabinowitz et al. 1996; Pugsley, 1993b). Die Frage nach der eigentlichen Rolle von Pas im Typ III Sekretionssystem wurde durch die Bestimmung der Topologie des Proteins verfolgt. Bereits Datenbanksuchen und sequenzanalytische Vergleiche hatten gezeigt, dass Pas schwach homologe Vertreter in Typ III Sekretionssystemen anderer Bakterien besaß, deren Funktion bislang nicht aufgeklärt worden sind (PscD aus *P. aeruginosa* und YscD aus *Y. enterocolitica* und *Y. pestis*). Der Vergleich der Hydrophobizitätsplots dieser Proteine zeigte nahezu identische Charakteristika, obgleich die Homologien von PscD und YscD zu Pas_{EDL933} auf der Ebene der Aminosäuresequenzen gering waren (21% bzw. 24-26% Identität), was auf eine strukturelle Konservierung dieser Proteine hindeutet. Das herausragende Merkmal dieser Proteingruppe sind zwei Transmembran Domänen im N-terminalen Abschnitt der Aminosäuresequenz. Überdies weist die zweite Transmembrandomäne Homologien zu bakteriellen Permeasen auf. Damit wurden Hinweise auf die Funktion von Pas als essentiellem Transportprotein des Typ III Sekretionsapparates erhalten. Der Nachweis der Lokalisation von Pas_{EDL933} in der inneren bakteriellen Membran vervollständigt dieses Bild, wobei diese Topologie offensichtlich mit einer Modifikation des Proteins einhergeht. Die Art der Modifikation allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, schien es sich doch weder um eine Phosphorylierung, noch um Ester- oder Thioesterbindungen von Fettsäuren zu handeln. Sollte es sich bei der Modifikation um die Anbindung von Fettsäuren handeln, so kämen nur Hydroxylamin-resistente Bindungen wie z.B. Amid-Bindungen in Frage. Oftmals handelt es sich hierbei um Myristat-Verbindungen, und es deutete sich auf Grund von Motivsuchen an, dass es sich bei der Modifikation um Myristoylierungen handeln könnte. Allerdings zeigte sich auch, dass Pas_{EDL933} in seiner cytoplasmatischen Form sowie als aufgereinigtes His'-Fusionsprotein mehrere sekretierte Proteine binden konnte, wohingegen Pas_{EDL933} aus der inneren Membran diese Eigenschaft nicht besaß. Durchläufe Pas also einen alternierenden Zyklus aus Bindung an Zielproteine für die Sekretion und Abladung dieser Proteine das Typ III Sekretionssystem an/in der inneren Membran, wie dies für SecA beschrieben (Economou und Wickner, 1994) wurde, dann müßte ökonomischerweise die proteinablösende Modifikation von Pas_{EDL933} in der inneren Membran ein relativ schneller Prozess sein, um eine Ansammlung von unfunktionellem Pas_{EDL933} in der Membran zu vermeiden. So stellt sich weiterhin die Frage nach der Art der Modifikation von Pas und die Bedeutung der Sekretion der Esp-Proteine.

*pas*_{EDL933} sticht durch die Orientierung des Leserahmens aus dem unmittelbaren genetischen Umfeld (8 Gene upstream und 4 Gene downstream mit entgegengesetzten Orientierungen) hervor, charakterisiert durch einen *rho*-unabhängigen Terminator downstream des Gens, der *pas* von *eaeA* trennt. Das *pas*-Gen steht am Beginn einer Transkriptionseinheit und der Transkriptionsstart ist weniger als 100 bp vom Startcodon entfernt, wie aus 5'-RACE-Experimenten gefolgert wurde. Durch Primer Extension Analyse konnten zwei Startpunkte der Transkription auf 58 bp und 60 bp upstream vom Startcodon von *pas*_{EDL933} festgelegt werden, Daten nicht gezeigt). Die Transkription erfolgt demnach monocistronisch, scheint jedoch durch

ähnliche Einflüsse wie das *esp*-Operon und *sepL* aktiviert zu werden (Wachstumsphase, Temperatur, Mn^{2+} , Mg^{2+} , jedoch nicht Osmolarität *per se*). In der Tat weist der zugewiesene Promotorbereich starke Homologien zum Promotor des *esp*-Operons auf, wobei im Gegensatz zum *esp*-Operon der alternative Sigmafaktor σ^S offensichtlich keinen Einfluß auf die Expression von *pas*_{EDL933} ausübt.

pas ist neben *escF* das einzige bekannte Gen des Typ III Sekretionssystems, das im Prophagen zugewandten Abschnitt des LEE_{EDL933} situiert ist (Perna et al. 1998). Allerdings liegen auch in diesem Bereich noch nicht charakterisierte Gene, die über 98% Identität zu den Nukleotidsequenzen aus EPEC aufweisen. Insgesamt wurden zwölf Gene der veröffentlichten LEE-Sequenz dem Typ III Sekretionssystem zugeschrieben, so dass wahrscheinlich noch mehr als acht Gene hierfür zu bestimmen sind (Galán, 1997; Bogdanove et al. 1996). Die Gene des Typ III Sekretionssystems sind zum größten Teil hochkonserviert, und 16 der unbekannten ORFs im LEE zeigen Identitäten über 98% zu den respektiven EPEC-Sequenzen, so dass wahrscheinlich der gesamte Typ III Sekretionsapparat vollständig auf dem LEE kodiert vorliegt. Hierfür spricht auch, dass die Mobilisierung der gesamten LEE-Sequenz aus EPEC in einen *E. coli* K-12-Stamm zur Ausprägung des A/E-Phänotyps führte (McDaniel und Kaper, 1997).

4. SepL: ein regulatives Protein des Typ III Sekretionssystems

Upstream von *pas* und in entgegengesetzter Richtung kodiert liegt *sepL*, dem bislang keine Funktion zugesprochen wurde (Perna et al. 1998; Elliott et al. 1998). Elliott et al. vermutet die Beteiligung des Proteins im Typ III Sekretionssystem, was auch aus der Namensgebung *sep* (secretion of *E. coli* proteins) hervorgeht. Die Promotorbereiche für *pas*_{EDL933} und *sepL*_{EDL933} überschneiden sich wahrscheinlich, wenn auch nicht im kodierenden Bereich beider Gene. Auch *sepL*_{EDL933} wird entgegen den Vermutungen von Perna et al. (Perna et al. 1998) und Elliott et al. (Elliott et al. 1998) - monocistronisch transkribiert, wie RNA-Analysen an diesem und dem downstream folgenden *espA*_{EDL933} aufzeigten. Dies ist wegen der geringen Distanz des *sepL*-Operators und des *esp*-Operators (58 bp) durchaus erstaunlich und indiziert, dass der Promotorbereich des *esp*-Operons in den kodierenden Bereich von *sepL* fällt. Aus diesem Grunde ist die konstruierte Deletionsmutante von *sepL*_{EDL933} nur mit Einschränkung aussagekräftig (trotz intensiver Bemühungen konnte bislang keine bessere Mutante hergestellt werden). Der postulierte -35-Region fehlt in diesem Konstrukt drei Nukleotide, so dass die in der Deletionsmutante beobachtete schwächere Expression und darauf folgend die schwache Sekretion und die verminderte Adhärenz an HeLa-Zellen in der eingeschränkten Bindungseffizienz der RNA-Polymerase begründet liegen könnte. Allerdings kann trotzdem die Aussage getroffen werden, dass SepL im Prozess des A/E eine Rolle spielt, da eine Komplementationsmutante von EHEC EDL933 $\Delta sepL$, in der zwar *sepL*_{EDL933}, nicht aber die Gene des *esp*-Operons (*espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933}) zur Verfügung gestellt wurden, in ihrer Adhäsivität und Fähigkeit zur Aktinakkumulation wiederhergestellt wurde. Die Infektionseffizienz an HeLa-Zellen war bei dieser Komplementationsmutante nicht so groß wie beim Wildtyp, was möglicherweise auf die immer noch geringere Expression des *esp*-Operons zurückzuführen ist, wie dies auch aus der Analyse der sekretierten Proteine erkennbar war. Aber zweifelsfrei fördert die Expression von SepL *in trans* die Adhäsivität von EHEC und die

Ausprägung des A/E-Phänotyps. Zudem wurde die Sekretion eines unbekannten 54 kDa großen Proteins durch die Komplementation wieder aufgehoben.

Die Sekretion der einzelnen Esp-Proteine über das Typ III Sekretionssystem verläuft unabhängig voneinander, wie distinguierte *esp*-Deletionsmutanten von EPEC gezeigt haben (Lai et al. 1997; Kenny et al. 1996). Demnach sollte EspE, dessen Operator nicht direkt durch die Deletion von *sepL*_{EDL933} beeinträchtigt war, in dieser Mutante unbeeinflusst exprimiert und sekretiert werden.

Die Sekretionsrate von EspE erwies sich bei der Δ *sepL*-Mutante als genauso hoch wie beim Wildtypstamm, was darauf hindeutet, dass SepL kein essentieller Bestandteil des Typ III Sekretionsapparates ist, um Zielproteine auszuschleusen, und somit war die gestörte Sekretion der Proteine EspA, EspD und EspB keine Folge eines defekten Sekretionsapparates.

Interessanterweise zeigten sich aber bei der Analyse des Kulturüberstandes von EDL933 Δ *sepL* mehrere Banden für EspE im Western Blot, was eventuell auf die Degradation des Proteins hinweist. Es könnte also möglicherweise ein spezifisches Chaperon für EspE durch die Deletion von *sepL*_{EDL933} inaktiviert worden sein, wodurch das Protein bereits im Cytoplasma des Bakteriums vor proteolytischen Aktivitäten ungeschützt bliebe, und dadurch EspE und verkürzte EspE-Fragmente mit einem (N-terminalen) Sekretionssignal in das Medium sekretiert würden. Die Chaperon-Zielprotein-Interaktion des Typ III Sekretionssystems erfolgt sofort nach der Synthese des Zielproteins (Wattiau et al. 1996), und normalerweise führt das Fehlen spezifischer Chaperone zur Blockierung der Sekretion des betreffenden Zielproteins (Woestyn et al. 1996). Aber daß verkürzte Proteine auch tatsächlich sekretiert werden können, zeigt sich alleinst schon an der Sekretion von Reporterproteinen, die lediglich eine kurze N-terminale Sequenz des Zielproteins beinhalten (Wolff et al. 1998; Sory und Cornelis, 1994). Wainwright und Kaper berichtet darüber hinaus vom Vorliegen von Degradationsprodukten von EspA, EspD und EspD im Kulturüberstand, die anhand ihres N-Terminus identifiziert wurden (Wainwright und Kaper, 1998).

Die Detektion verkürzter EspE-Fragmente deutete auf das mögliche Fehlen eines spezifischen Chaperons hin. Da erste Hinweise für OrfU als spezifisches Chaperon für EspE veröffentlicht worden sind, könnte dessen Expression gestört sein. Ein weiterer potentieller Hinweis auf eine veränderte Regulation in der Deletionsmutante bietet die Übersekretion eines unbekannten 54 kDa großen Proteins. Die N-terminale Anequenzierung des Proteins und anschließende Sequenzanalyse ergab keine signifikanten Anhaltspunkte auf bekannte Proteine. Dies bedeutet, dass das kodierende Gen außerhalb der für EHEC und EPEC bekannten Sequenzbereiche liegt.

Ob das erste Methionin des N-Terminus auch das Produkt des Startcodons darstellt, ist nicht bekannt. Sollte dies der Fall sein, so wird auch dieses Protein möglicherweise über das Typ III Sekretionssystem sekretiert. Alternativ könnte es auch ein Zielprotein des Typ I Sekretionssystems sein, in dem ebenfalls keine Prozessierung stattfindet (Binet et al. 1997).

P54_{EDL933} scheint jedoch nicht das von Ebel et al. beschriebene sekretierte Protein vergleichbarer Größe zu sein, das in STEC 413.89-1 bei Wachstum in LB-Medium verstärkt sekretiert wurde (Ebel et al. 1996) und sich als Flagellin-Protein herausstellte (Ebel, pers. Mitteilung). Die Übersekretion des unbekannten P54_{EDL933} lieferte eine große Menge an Protein, so dass der N-Terminus sicher bestimmt werden konnte und auch für die Herstellung spezifischer Antikörper ausreichend sein sollte. Die Identität sowie die potentielle Bedeutung von P54_{EDL933} in der

Pathogenität von EHEC könnten in Zukunft durch die Identifizierung und Analyse des Genlocus sowie durch die Bestimmung der Topologie und Bedingungen der Expression aufgeklärt werden. Die Rolle von SepL_{EDL933} als Regulator wird durch die Identifizierung mehrerer Motive DNA-bindender Proteine unterstützt. Das Leucin-Zipper-Motiv (LZM) ist an der Bildung von Dimeren beteiligt und gibt dadurch zwei parallele positiv geladene Bereiche frei (für jede Untereinheit einen Bereich), die in der DNA-Bindung involviert sind (Lewin, 1991; Landschulz et al. 1988). In unmittelbarer Nähe zum LZM auf der N-terminalen Seite der Aminosäuresequenz aus SepL_{EDL933} finden sich fünf positiv geladene Lysine, etwas weiter N-terminal weitere fünf Lysine und ein Arginin. Als Homodimer würde SepL_{EDL933} somit vier positiv geladene Bereiche für eine potentielle Bindung an die DNA zur Verfügung stellen (s. Abb. 81).

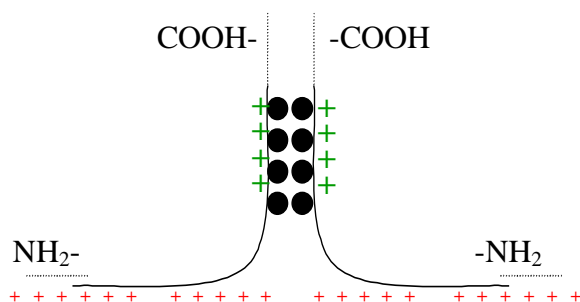


Abb. 81: Schematische Darstellung einer putativen Homodimerisierung von SepL_{EDL933} (nach Lewin, 1991).
 (●) Hydrophobes Interface aus Leucin und Methionin;
 (+) positiv geladene Reste zur Solvatisierung des LZM;
 (+) putative DNA-Bindungsstellen. (NH₂-) N-Terminus von SepL; (COOH-) C-Terminus von SepL.

Der N-terminal gelegene potentielle Bindungsbereich weist zudem eine signifikante Übereinstimmung mit dem KRY-Motiv der DNA Polymerase Familie B auf, was die Theorie eines DNA-Bindungspotentials dieses Bereiches unterstützt. Innerhalb des LZM finden sich ebenfalls positiv geladene Lysine. In einem *helical wheel* betrachtet stehen sich die Leucine und diese Lysine des LZM direkt gegenüber, was bedeuten dürfte, dass die hydrophobe Wechselwirkung der Leucine zweier Untereinheiten, die zur Ausbildung des 'Reißverschlusses' eines Dimers führt, mit Hilfe polarer Reste unterstützt wird, die die Solvatisierung dieses Konstruktes und somit dessen Stabilität fördern. Für eine weitere Stützung dieser Hypothese bedürfte es der röntgenkristallographischen Analyse des Proteins oder wenigstens der computergestützten Erstellung eines dreidimensionalen Strukturbildes, wobei gegenwärtig keine genügend homologen Proteine in den hierfür spezifischen Datenbanken vorliegen.

Zwar ergab die Analyse mit dem GOR-Algorithmus (Garnier et al. 1996), dass zwischen den N-terminalen Helices ein Knick (*turn*) ausgebildet werden könnte, aber ein klassisches Helix-Turn-Helix-Motiv (HTHM) enthält lediglich drei Aminosäuren zwischen den α -Helices (Harrison und Aggarwal, 1990). Für SepL wurden hingegen zwölf Aminosäuren vorhergesagt, die in diesen Knick-Bereich fallen. Das HTHM im N-Terminus wurde für Regulatoren der LysR-Familie als Charakteristikum beschrieben (Schell, 1993) und die Untersuchung der Aminosäuresequenz von SepL_{EDL933} in Hinblick auf das Sequenzmotiv der LysR-Familie (Henikoff und Henikoff, 1994) zeigte, dass nur vier aus 31 Aminosäuren von der Konsensussequenz abwichen. So gibt es Charakteristika in SepL_{EDL933}, die an die LysR-Regulatorfamilie erinnern, nicht aber konserviert vorliegen. Einen besseren Hinweis auf das potentielle Vorliegen eines DNA-bindenden Proteins bietet die Andeutung eines Helix-Loop-Helix-Motivs (HLHM) im N-Terminus von SepL_{EDL933}. Dieses Motiv wurde im N-Terminus vieler eukaryontischer Proteine nachgewiesen, die eine regulatorische Funktion ausüben (Murre et al. 1989a; Davis et al. 1987; Braun et al. 1989;

Benezra et al. 1990). Das HLHM scheint für die Multimerisierung der Regulatoren verantwortlich zu sein und übt in indirekter Weise eine regulatorische Funktion aus, indem es entweder die DNA-bindende Eigenschaft des Protein-Komplexes erhöht (Murre et al. 1989b; Davis et al. 1987) oder bei Fehlen einer DNA-bindenden Region in Konkurrenz zu DNA-bindenden Untereinheiten tritt und durch die Bildung unfunktionaler Protein-Komplexe die Regulatoren inhibiert (Benezra et al. 1990). Als DNA-bindende Regionen sind in dieser Proteinfamilie basische Bereiche unmittelbar N-terminal vom HLHM beschrieben worden (Benezra et al. 1990). In SepL_{EDL933} wurde hingegen ein basischer Bereich C-terminal vom putativen HLHM entdeckt.

Nach diesen Hinweisen wurden DNA-Bindungsstudien an Promotorbereichen der IR_{EDL933} durchgeführt, allerdings ohne Erfolg. Die Übersekretion eines unbekannten Proteins könnte daher auf eine *in trans* Beeinflussung außerhalb des LEE_{EDL933} und/oder den regulatorischen Eingriff auf eine höhere hierarchische Ebene hindeuten, beispielsweise die Inhibition eines anderen Regulators durch Komplexierung. Zur weiteren Einengung einer potentiellen DNA-bindenden Funktion von SepL_{EDL933} wäre daher grundlegende Experimenten notwendig, wie z.B. die Methode von Tanaka (Tanaka et al. 1993), in der ein Gemisch zufälliger Oligomere mit gleichen, externen spezifischen Primersequenzen als DNA-Pool dient und solche Oligomere selektiert werden, die durch das Protein gebunden werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass nicht nur die DNA-Bindung nachgewiesen werden kann, sondern dass gleichzeitig die spezifische DNA-Sequenz bestimmbar ist. Zu berücksichtigen ist hier bei auch, dass das LZM die Möglichkeit der Bildung von Heterodimeren zur vollen Funktionstüchtigkeit von SepL_{EDL933} beinhaltet. Ebenso sollte in Erwägung gezogen werden, ob SepL_{EDL933} als His'-Fusionsprotein nicht reaktiv war oder eine Modifikation wie z.B. eine Phosphorylierung des Proteins notwendig ist.

Die Lokalisierung von SepL_{EDL933} ergab, dass das Protein im Cytoplasma vorhanden war, was für ein DNA-bindendes Protein zu erwarten ist. Darüber hinaus jedoch lag SepL_{EDL933} in mit der äußeren Membran von EDL933 assoziiert vor. Die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse ergab, dass SepL_{EDL933} im Wildtyp-Stamm während einer Infektion an HeLa-Zellen nur bei wenigen Bakterien detektierbar war. Erst die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der komplementierten *sepL*-Mutante und der wahrscheinlich hierdurch unstöchiometrischen Expression von SepL_{EDL933} belegte eindeutig, dass SepL_{EDL933} in bzw. an der äußeren Membran vorlag und externe Bereiche besaß, die für Antikörper zugänglich waren. Diese Topologie war nicht vorhersehbar gewesen, zumal computergestützte Algorithmen für die Aminosäuresequenz keine transmembranen Domänen andeuteten. SepL_{EDL933} besitzt auch keine N-terminale Signalsequenz, so dass der Export durch die innere Membran *sec*-unabhängig erfolgt. Das Auffinden von SepL_{EDL933} in der Fraktion der äußeren Membran bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass SepL_{EDL933} ein integrales Membranprotein ist, sondern es könnte fest mit (einem) anderen Protein(en) assoziiert vorliegen. Daraufhin durchgeführte Proteinbindungsstudien von SepL_{EDL933} enthüllten, dass SepL_{EDL933} in der Lage ist, an ein sekretiertes Protein der Größe von etwa 90 kDa zu binden. Welche Rolle SepL in der äusseren Hülle des Bakteriums mit Kontakt zur Umwelt einnimmt, bleibt aufzuklären.

5. EspA ist die Hauptkomponente eines Typ III Sekretionssystem-abhängigen Translokationsapparates für Effektoren

Die Funktion von EspA in EPEC liegt nach Aussagen von Kenny et al. in der Vermittlung der Signaltransduktion, die u. a. zur Aktinakkumulation führt (Kenny et al. 1996). Diese Hypothese entsprang der Beobachtung, dass *espA*-Deletionsmutanten von EPEC zwar um einen Faktor von zehn schlechter an die Epithelzellen binden konnten, nicht aber eine gerichtete Akkumulation von Aktin unterhalb der adhärennten Bakteriendurchführten. Zu einem ähnlichen Ergebniskamen Abe et al. nach Untersuchungen an *espA*-Mutanten aus RDEC-1, die sogar vergleichbar gut wie der Wildtyp an die Wirtszellen adhärennten (Abe et al. 1997). Die in EHEC EDL933 und STEC 413.89-1 konstruierten Deletionen in *espA* hingegen führten zum Verlust der Adhäsivität an HeLa-Zellen (Ebel et al. 1998; diese Arbeit), was einen bedeutenden Hinweis auf die Rolle von EspA in STEC-Stämmen gibt, auch eine initiale Bindung an die Wirtszelle zu vermitteln. EPEC produzieren BFP, die eine Bindung an eukaryontische Zellen vermitteln können (Girón et al. 1991), und RDEC-1 bildet AF/R1-Adhäsine (Wolf und Boedeker, 1990), die in vielleicht noch besserer Weise als BFP den Verlust der durch EspA vermittelten Bindungseigenschaft maskieren können. EHEC dagegen besitzen keine BFP (Gunzburg et al. 1995; Ebel et al. 1998) und die Rolle eines in EHEC beschriebenen fimbrialen Faktors (Karch et al. 1987) wurde bislang nicht weiter aufgeklärt; doch scheint diese Oberflächenstruktur nicht die Adhäsion an HeLa-Zellen zu vermitteln, da die Adhäsivität der *espA*-Mutante nahezu vollständig aufgehoben war. Zudem genügt bereits der Transfer des LEE in einen nicht-pathogenen *E. coli*-Stamm, um diesem die volle Fähigkeit zur A/E zu übertragen (McDaniel und Kaper, 1997), somit also die Durchführung einer initialen und anschließend engen Bindung an die Wirtszellen, wodurch die ursprünglich zugewiesene Monopolstellung plasmidkodierter Adhäsionsfaktoren an der initialen Bindung (Rosenshine et al. 1996b; Donnenberg et al. 1992) weiter in Frage gestellt wird.

Die Analyse der Aminosäuresequenz deutete daraufhin, dass EspA eine *coiled-coil* Domäne enthält, die einem Motiv aus Flagellin-Molekülen homolog ist. Dieses Motiv dürfte für die Multimerisierung von Flagellin-Untereinheiten verantwortlich sein (Lupas et al. 1991). Es könnte möglicherweise auch ein Signal für den Transport mittels des Typ III Sekretionssystems bilden, da in vielen Zielproteinen des Typ III Sekretionssystems *coiled-coil* Strukturen gefunden wurden (Pallen et al. 1997) und das Typ III Sekretionssystem in dieser Hinsicht an den Aufbaumechanismus von Flagellen und Pili erinnert (Knutton et al. 1998). EspA aus STEC 413.89-1 bildet mindestens Dimere und Trimere aus (Ebel et al. 1998), und Western Blots mit Kulturüberständen aus EDL933 resultierten bisweilen in ebenfalls höhermolekularen Signalen. HrpA aus *P. syringae* ist wie EspA ein Zielprotein des Typ III Sekretionssystems. Es bildet die Hauptkomponente filamentöser Oberflächenstrukturen, die eine Bindung der Bakterien an die Wirtszelle und/oder die Translokation von Effektormolekülen vermitteln (He, 1997), und aufgereinigtes HrpA assimiliert spontan zu höhermolekularen Filamenten (Roine et al. 1997a). Die Hypothese, dass das Typ III Sekretionssystem in der Biosynthese von Oberflächenorganellen involviert ist, wurde bereits 1993 von Carpenter et al. aufgestellt (Carpenter et al. 1993). Der Nachweis, dass EspA ebenso in der Ausbildung filamentöser Oberflächenstrukturen involviert ist, gelang durch immunfluoreszenzmikroskopische und immunoelektronenmikroskopische Analysen. Die beobachteten Strukturen erinnerten an die

surface appendages (Invasomen) von *Salmonella*, die durch die Pathogenitätsinsel SPI1 kodiert werden und für die Invasion der Bakterien verantwortlich sind (Ginocchio et al. 1994). Während der Begutachtung der Veröffentlichung über EspA (Ebel et al. 1998) erschien die Publikation von Knutton et al. über EspA aus EPEC (Knutton et al. 1998), in der vergleichbare Ergebnisse gezeigt wurden. STEC/EPEC bildeten 30 nm bzw. bis 50 nm dicke, bis zu 2 µm lange Filamente, die mit EspA spezifischen Antikörpern reagierten und somit EspA als eine Hauptkomponente dieser *surface appendages* auswiesen. Diese EspA-Filamente waren aus Bündeln dünnerer Stränge von etwa 7-8 nm Dicke aufgebaut und etablierten eine direkte Verbindung vom Bakterium zur Wirtszelle. Es wurden auch interbakterielle Filamente beobachtet, die möglicherweise an der Ausbildung von Mikrokolonien bei EHEC mitwirken, aber die Hauptfunktion dieser Strukturen könnte in der Etablierung von Transportkanälen für die Translokation von Effektorproteinen in die Zielzelle liegen. Auch hier drängt sich die Parallele zum Flagellensystem auf, indem während der späten Phase der Biosynthese Flagellin-Monomere durch eine Pore im flagellaren Filament transportiert werden (Emerson et al. 1970). Tatsächlich traten diese Verbindungen noch vor der engen Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle auf und wurden, wenn auch nur langsam, nach der Anhaftung der Bakterien zurückgebildet (Knutton et al. 1998; Ebel et al. 1998). Dies steht auch im Einklang mit Regulationsstudien am *esp*-Operon, bei denen die Einstellung der Expression *esp*-Operon-kodierter Proteine in eng adhärenenten Bakterien registriert wurde (Beltrametti et al. 1999). Die EspA-Filamente könnten also als Translokatorapparat für die gezielte Translokation des Intimin-Rezeptors und anderer Effektorproteine in die Wirtszelle dienen. Knutton et al. konnten die postulierte Translokationsfunktion der EspA-Filamente nachweisen, indem sie zeigten, dass EspB sowie EspB-Cya-Fusionen in direkter Abhängigkeit von EspA translokiert wurden (Knutton et al. 1998). Eine Folge des Verlustes einer *espA*-Deletionsmutante aus STEC, Effektorproteine transportieren zu können, wurde durch Ebel et al. (Ebel et al. 1998) beschrieben. Neutrophile werden durch bakterielle Infekte des Darmes angezogen (Dean-Nystoc et al. 1997). Wie EPEC besitzen auch STEC anti-phagocytotische Eigenschaften, die ihre Kolonisierung auf Makrophagen ermöglichen (Goosney et al. 1999; Ebel et al. 1998); die *espA*-Mutante von STEC 413.89-1 dagegen war nicht mehr in der Lage, ihre phagocytotische Aufnahme durch J774-A1-Makrophagen zu verhindern (Ebel et al. 1998), wahrscheinlich weil in dieser Mutante keine Translokation putativer anti-phagocytotischer Effektoren erfolgte.

Es stellt sich die Frage, welche Komponenten neben EspA die Filamente aufbauen und welche dieser Komponenten die adhäsive Eigenschaft besitzen, an Epithelzellen binden zu können. Denkbar ist, dass an der Spitze eines Filamentes bindende Proteine gelagert sind, da die Bakterien-Zell-Kontakte stets vertikal zur Epithelzelle beobachtet wurden und keine Filamente längs der eukaryontischen Oberfläche verliefen. Oftmals stellten die EspA-Filamente die Verbindung zu Mikrovilli her, wobei die Abgrenzungen zwischen prokaryontischer und eukaryontischer Oberfläche in der rasterelektronenmikroskopischen Analyse nicht mehr nachvollziehbar waren. Mikrovilli lagerten jedoch auch entlang der Bakterienoberfläche, was eventuell mit einer Bindung an beobachtete Ausläufer der EspA-Filamente entlang der bakteriellen Oberfläche einhergeht. Ob die aufgelagerten EspA-Filamente *in vivo* vorkommen oder Artefakte der Präparation für die elektronenmikroskopischen Studien waren, wurde nicht differenziert.

Die Kopplung von aufgereinigtem EspA an Latex-Beads brachte keine klare Aussage über die Bindungseigenschaften von EspA an HeLa-Zellen. Ein Problem in diesem Testsystem war sicherlich, dass die zunehmende Adhäsivität von EspA nicht sehr groß ist (Knutton et al. 1998), so daß adhären- und nicht-adhären- te Beads nach Waschen der Monolayer nur schlecht voneinander unterschieden werden können.

6. EspD wird in die Wirtszellmembran inseriert und fungiert möglicherweise als Translokator für Effektorproteine

EspD wurde als eine weitere potentielle Komponente der EspA-Filamente vorgeschlagen (Knutton et al. 1998), da eine *espD*-Mutante von EPEC geringere Mengen an EspA sekretierte (Lai et al. 1997; Knutton et al. 1998), die EspA-Filamente dieser Mutante kürzer waren als die des Wildtyps und die Adhäsion an die eukaryontischen Zielzelle eingeschränkt war (Knutton et al. 1998). Im Gegensatz hierzu war die Sekretion von EspA und EspB durch die nicht-polare *espD*-Deletionsmutante von EDL933 nicht vermindert. Wie aus Plattierungsstudien, immunfluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopischen Analysen hervorging, war die Adhäsivität dieser Mutante eingeschränkt, jedoch nicht absolut unterbunden und unterschied sich so von der *espA*-Mutante von EDL933. Allerdings resultierten sehr stringente Waschbedingungen während der Infektion in dem völligen Fehlen adhären- ter Bakterien auf HeLa-Zellen, so daß die geringere Adhärenz aus einer schwachen Bindung resultierte, demnach also intimin- und nicht intimin- involviert war oder über Integrin eine schwächere Bindung einging, als es mit dem Intimin-Rezeptor EspE möglich wäre. Da eine Intimin-EspE-Bindung durch die Mutante nicht erreicht wurde, kann daraus geschlossen werden, daß keine Aktinakkumulation erfolgte, wohingegen EspE/Tir für dieses Ereignis als Nukleator fungiert (Kenny, 1999). Hingegen war das Verhältnis von intrazellulären zu adhären- ten Bakterien der *espD*-Mutante höher als beim Wildtyp. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für den Erhalt einer gleichen Anzahl intrazellulärer Bakterien bei der Infektion mit dem Wildtypstamm bzw. mit der *espD*-Mutante würde sich eröffnen, wenn ein für die Invasion notwendiger eukaryontischer Rezeptor nur in begrenzter Anzahl zur Verfügung stünde. Damit könnte sich die Situation ergeben, daß bereits die geringe Anzahl adhären- ter Bakterien diese Rezeptoren sättigt. Sollte dies der Fall sein, so müßte für die Invasion von EHEC ein anderer Mechanismus oder das Fehlen eines alternativen Mechanismus als für die Invasion von EPEC postuliert werden, da EPEC um ein 10-faches stärker invasiv ist als EHEC. Durch die Koinfektionen eines EHEC-Stammes mit einer EPEC-Mutante, der Intimin fehlte und die dadurch nicht eng an die Wirtszellen anhaftete, konnte nachgewiesen werden, daß die Invasivität von EHEC durchaus gesteigert werden kann (Ismaili et al. 1998). Tatsächlich konnte von mehreren Autoren gezeigt werden, daß die Invasivität sowohl von EPEC als auch von EHEC in Abhängigkeit von der eukaryontischen Zelllinie variierte (Oelschlaeger et al. 1994; McKee und O'Brien, 1995; Matthews et al. 1997). In dieser Arbeit wurde darüber hinaus registriert, daß sich selbst Sub-Zelllinien von HeLa-Zellen in ihrer Disposition zur Aufnahme von EHEC unterschieden. Matthews et al. berichteten, daß die Aufnahme von EHEC in MAC-T-Zellen (*bovine mammary secretory cells*) Mikrofilament-abhängig, aber unabhängig von Mikrotubuli war (Matthews et al. 1997), und Oelschlaeger et al. fanden Unterschiede in der Nutzung von Mikrofilamenten bei der Invasion durch EHEC in

verschiedene Zelllinien (Oelschlaeger et al. 1994). Die Invasion durch EPEC scheint dagegen generell Mikrofilament- und Mikrotubuli-abhängig zu sein (Francis et al. 1991). Ob durch die Koinfektion von EHEC und einer *eaeA*-Mutante von EPEC der Aufnahmemechanismus über Mikrofilamente für EHEC zugänglich gemacht wird und daher eine höhere Zahl intrazellulärer Bakterien zu finden ist, muss geklärt werden. Alternativ könnte die Translokation von EPEC-Effektoren, die über die EspA-Filamente ohne eine enge Anhaftung der Bakterien an die Wirtszelle möglich ist, eine verbesserte Grundlage oder eine zusätzliche Komponente für die Invasion liefern. Bemerkenswert ist, daß im Falle einer Koinfektion phosphorylierte Proteine innerhalb der eukaryontischen Zelle ähnlich wie bei der Infektion mit EPEC zu finden sind (Ismailiet al. 1998).

Die Komplementation der *espD*-Mutante von EDL933 zeigte, daß durch die Verfügbarkeit von *espD in trans* die Adhärenz und die Fähigkeit zur fokalen Akkumulation von Aktin wiederhergestellt werden konnte, die mit dem Wildtypstamm vergleichbar war. Für die Komplementation von EHEC EDL933 $\Delta espD$ wurde ein Plasmid eingesetzt, das außer dem intakten Gen für EspD auch den Bereich upstream bis zum 3'-Bereich von *eaeA* enthielt. Somit war in dieser Komplementationsmutante die Expression von *espD* durch den natürlichen Promotor des *esp*-Operons möglich. Daß allerdings der upstream-Bereich nicht per se die Komplementation ermöglichte, wurde dadurch gezeigt, dass die *espD*-Mutante nicht durch ein Plasmid komplementierbar war, das den gleichen LEE-Abschnitt, jedoch ohne das vollständige *espD*-Gen, enthielt. Ebenso konnte in der *espD*-Mutante ein polarer Effekt auf die downstream des deletierten Bereiches kodierten Gene ausgeschlossen werden, da die Komplementation der Mutante mit einem Plasmid erfolgte, das kein intaktes *espB* enthielt.

Die stehende Anzucht der *espD*-Mutante führte zu einer lockeren Sedimentation der Kultur, die nicht beim Wildtypstamm beobachtet wurde. Wurde die *espD*-Mutante mehrere Tage bei 37°C unter Schütteln in Zellkulturmedium inkubiert, erfolgte die Zusammenklumpung der Bakterien zu runden Pellets und es konnten Proteinpräzipitate beobachtet werden, die an die Induktion der Proteinsekretion von *Yersinia* nach einem Temperaturshifter innerten (Michielset al. 1990). Der Wildtypstamm von EHEC wies dagegen nur wenig Präzipitat auf. Wie bei *Yersinia* ist auch in dem Fall der *espD*-Mutante denkbar, daß die hydrophob sekretierten Proteine aggregieren oder zu makromolekularen Strukturen autoassimilieren. Offensichtlich verhindert die Produktion und Sekretion von EspD die unkoordinierte Aggregation von einem solchen Ausmaß, wodurch erklärt würde, warum EspD für die Bildung der EspA-Filamente und für die Translokation von EspB notwendig ist.

Einige adhären te Bakterien der *espD*-Mutante an J774-A1- und HeLa-Zellen wiesen Aggregate auf ihrer Oberfläche auf, was auch bei Bakterien im Zellkulturmedium entdeckt wurde. Diese Aggregate verbanden sich mit Bakterien, so dass viele Bakterien miteinander verklumpten. Dieser Befund erklärte die Beobachtung, dass die *espD*-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp und zu anderen Mutanten von EHEC EDL933 (i.e. *espA*, *pas*, *sepL*) unbeweglich war und in stehenden Übernachtskulturen sedimentierte. Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen der *espD*-Mutante mit einem spezifischen Antikörper gegen EspA ließen vermuten, dass es sich bei diesen Aggregaten um sekretiertes und an der Oberfläche der Bakterien anhaftendes EspA handelte, das nicht in koordinierte EspA-Filamente aufgebaut wurde. Somit wurde die Aussage von Knutton et al. bestätigt, dass EspD für den Aufbau der EspA-Filamente notwendig sei

(Knutton et al. 1998). Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen des Wildtyps EHEC EDL933 mit einem spezifischen Antikörper gegen EspD sollten zeigen, ob EspD in direkter Weise als zweite Komponente der EspA-Filamente involviert ist. EspD konnte jedoch nicht als Bestandteil der Filamente nachgewiesen werden. Vielmehr wurden unterhalb adhärenter Bakterien große Mengenspezifisch gegen EspD gefärbter Bereiche detektiert. Die vertikale Sektionierung mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie unterstützte die Lokalisation von EspD unterhalb der Bakterien. Die Ansammlung gegen EspD gefärbter Bereiche unterhalb der Bakterien erinnerte an die Lokalisation von EspB während Infektionen mit EPEC (Wolff et al. 1998). Eine Kreuzreaktion des verwendeten monoklonalen Antikörpers mit EspB_{EDL933} konnte jedoch ausgeschlossen werden, da in der Western Blot Analyse der fraktionierten *espD*-Mutante kein Signal erhalten wurde, wohingegen die Expression und Sekretion von EspB_{EDL933} durch diese Mutante nachgewiesen werden konnten. Wegen der beobachteten fokalen Akkumulation von EspD deutet sich die mögliche Integration von EspD während der Infektion mit EDL933 in die Cytoplasmamembran der Wirtszelle an.

Bereits die Sequenzanalyse hatte ergeben, dass EspD mindestens drei wahrscheinliche Transmembrandomänen besitzt, und die computergestützte Topologievorhersage erbrachte erste Hinweise auf die Insertion des Proteins in eukaryontische Membranen. Die Analysen von EspD aus EPEC und YopB aus *Y. enterocolitica* hatten zwei hydrophobe Domänen aufgezeigt, die möglicherweise in der Insertion der Proteine in die Zielzelle beteiligt sind (Pallen et al. 1997).

Um die Möglichkeit der Insertion von EspD in die Cytoplasmamembran der eukaryontischen Zellen zu verifizieren, wurden infizierte HeLa-Zellen fraktioniert und die Fraktionen durch Western Blot Analyse auf die Präsenz von EspD untersucht. EspD konnte in der Cytoplasmamembran sowie in geringerer Menge im Cytosol der Epithelzellen nachgewiesen werden. Diese Topologie ähnelt der von EspB (Wolff et al. 1998) und es drängt sich die Vermutung auf, dass EspB und EspD analog zu YopB und YopD interagieren und als Translokatoren in der Zellmembran eukaryontischer Zellen fungieren, wobei in EHEC/EPEC beide Proteine dieses putativen heteromeren Komplexes neben ihrer Translokation in das Cytosol vorwiegend in der Cytoplasmamembran verbleiben, während im System von *Yersinia* YopB in der Cytoplasmamembran verweilt und YopD weiter in das Cytosol translokiert wird (Håkansson et al. 1996b; Francis und Wolf-Watz, 1998).

Eine *espB*-Mutante von EPEC produzierte EspA-Filamente, eine *espD*-Mutante dagegen nur stark verkürzte Filamente (Knutton et al. 1998) und eine *espD*-Mutante aus EHEC bildete nur noch unstrukturierte EspA-Filamente. Wenn aber EspD mit EspB als Translokator in der Cytoplasmamembran der Wirtszelle inseriert vorliegt, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der Beeinflussung von EspD auf die Ausbildung der EspA-Filamente. Einen Ansatz zur Klärung dieses Phänomens sollte durch die Untersuchung der aufgereinigten Proteine EspA, EspD und EspB liefern. Wie für EspB allein versucht worden ist, hätte für eine Mischung beider Proteine die mögliche Bildung eines heteromeren Komplexes und dessen putative porenbildende Eigenschaft wie auch verschiedene Protein-Protein-Interaktionen definierter Komponenten analysiert werden können. Der Versuch einer Überexpression von EspD als His'-EspD-Fusionsprotein schlug jedoch fehl, und auch die verminderte Expression eines Fusionskonstruktes durch Substratrepression erzielte kein Ergebnis. Analog berichteten Neyt und Cornelis, dass das homologe Protein aus *Yersinia*, YopB, als Fusionsprotein toxisch für *E. coli*

XL1 Blue war, wenn nicht simultan das Chaperon für YopB, SycD, exprimiert wurde (Neyt und Cornelis, 1999). Versuche mit EspD und EspB sollten daher möglicherweise das für diese beiden Proteine spezifische Chaperon CesD (Wainwright et al. 1998) mit einbeziehen. Für EspD aus STEC und EPEC wurden bislang keine Funktionen nachgewiesen, so dass die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung einen weiteren Schritt in der Aufklärung der Rolle von EspD in der Pathogenität darstellt.

7. Genetische Organisation und Regulation der IR EDL933

Die Sequenzanalyse für *pas*_{EDL933} hatte bereits angedeutet, dass *pas/esc* ein eigenes Operator bildet. Aber die enge Situierung von *sepL*, *espA*, *espD* und *espB* hatte vielfach Spekulationen um die genetische Organisation dieser Virulenzgene aus EHEC/EPEC hervorgerufen. Donnenberg et al. vermuteten, dass *espB* einen eigenen Promotor besitzt (Donnenberg et al. 1993b), andere (Perna et al. 1998; Elliott et al. 1998) stellten die naheliegende Hypothese auf, die Gene einschließlich *sepL* könnten co-transkribiert werden. 5'-RACE Experimente zeigten jedoch, dass sowohl *pas*_{EDL933} als auch *sepL*_{EDL933} monocistronisch transkribiert werden. Weitere Versuche zur Regulation dieser Gene wurden von F. Beltrametti durchgeführt und bestätigten die monocistronische Transkription von *pas* bzw. *sepL*. Das 5'-RACE Experiment deckte gleichzeitig auf, dass *espA*_{EDL933} das erste Gene einer neuen Transkriptionseinheit ist, wozu auch *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} gehörten. Die Northern Blot Analyse ergänzte diese Aussage, wonach *espA*_{EDL933}, *espD*_{EDL933} und *espB*_{EDL933} ein eigenes Operon (*esp*-Operon) bilden. Diese Anordnung ähnelt der Organisation der Gene *sseBCD* für die homologen Effektorproteine des SPI2-Locus aus *Salmonella* (Hense et al. 1998), allerdings fehlt im *esp*-Operon ein zwischen *espA* und *espD* lokalisiertes Gen für ein dem Chaperon SscA aus *Salmonella* homologes Protein. Für die downstream gelegenen Gene waren zum Zeitpunkt dieser Experimente keine Sequenzen bekannt, so dass Sonden hierfür nicht einbezogen werden konnten. Allerdings indiziert schon die Größe des bestimmten mRNA-Transkripts von etwa 2,8 kb, dass das Gen downstream von *espB*_{EDL933} (L0019) mit einer Länge von 408 bp nicht beinhaltet sein kann. Für *espB*_{EDL933} waren keine zusätzlichen Signale im Northern Blot erhalten worden und das 5'-RACE Experiment für *espB*_{EDL933} hatte nur zu einem schwachen Produkt von etwa 2,3 kb geführt, was auf die Länge der zu erwartenden cDNA- und PCR-Produkte durch die 3'-terminale Position von *espB*_{EDL933} auf dem mRNA-Transkript zurückgeführt wurde. Nach diesen Ergebnissen konnte unter den angewandten Bedingungen für die Anzucht der bakteriellen Kulturen und die Isolierung der RNA eine zweite Promotorstelle für *espB*_{EDL933} ausgeschlossen werden.

Somit sind die Gene der sekretierten Proteine EspA, EspD und EspB auf einem Operon lokalisiert und werden demnach gemeinsam reguliert. Die in EPEC bei Kontakt mit eukaryontischen Zellen beobachtete *de novo* Biosynthese und Sekretion (Rosenshine et al. 1996a) sollte sich damit zumindest teilweise durch die Aktivierung des EspA-Promotors erklären lassen. Die 5'-RACE Experimente hatten bereits den Hinweis auf den Bereich des Transkriptionsstartes des *esp*-Operons gegeben, deuteten allerdings auf einen gleitenden Startpunkt der Transkription hin. Eine genauere Bestimmung des Transkriptionsstartes wurde aus einer Primer Extension Analyse erhalten. Infolgedessen konnten auch die potentielle Pribnow-Schaller-Box und die -35-Box identifiziert werden. Die -10-Sequenz weist starke

Homologien zur möglicherweise σ^{70} -abhängigen -10-Sequenz von *bfpA* (Puente et al. 1996) auf, dem Gen für die Hauptkomponente der BFP aus EPEC, sowie zur σ^S -abhängigen -10-Sequenz von *osmE* (Conter et al. 1997). Dieser Befund harmoniert mit Ergebnissen aus EPEC, die für die Gene *perABC/bfpTVW* die Kodierung eines globalen Regulators zur Expression der BFP (Tobe et al. 1996; Puente et al. 1996), EspB (und nach den vorliegenden Erkenntnissen somit auch EspA und EspD) und Intimin (Gomez Duarte und Kaper, 1995) sowie möglicherweise weiterer sekretierter Proteine (Kenny und Finlay, 1995) postulieren. PerA/BfpT ist ein AraC-homologer Transkriptionsaktivator (Tobe et al. 1996; Gomez Duarte und Kaper, 1995) und bindet direkt upstream von *bfpA* und *aeA* (Tobe et al. 1996). Allerdings ist PerA/BfpT in EPEC auf dem Megaplasmid kodiert und in EHEC wurde bislang kein zu EPEC homologes *perABC/bfpTVW*-Operon identifiziert. Es stellte sich also die Frage, ob die Expression des *esp*-Operons in EHEC ebenfalls vom Megaplasmid abhängig ist.

Verschiedene β -Galaktosidase-Fusionen wurden konstruiert, mit deren Hilfe die Expression des *esp*-Operons unter verschiedenen definierten Bedingungen untersucht werden konnte. Anhand eines STEC-Stammes konnte so gezeigt werden, dass die Promotoraktivität des *esp*-Operons im Vergleich zu einer niedrigen Osmolarität bei hoher Osmolarität 8-10fach beim Wildtyp und nur 2-4fach bei einem plasmidlosen Derivat anstieg. Somit scheint auch auf dem Megaplasmid von STEC-Stämmen ein Transkriptionsaktivator kodiert vorzuliegen.

Osmolarität ist ein weit verbreitetes Signal für die Regulation von Virulenzfaktoren (Porter und Dorman, 1994; Mekalanos, 1992; Kenny et al. 1997a) und in Abhängigkeit vom spezifischen Infektionsort des Organismus ist die Expression *in vitro* unter einer äquivalenten Osmolarität am höchsten (Mekalanos, 1992). Die optimale Expression des *esp*-Operons wurde mit 430 mM NaCl bestimmt und durch Experimente mit einer equiosmolaren Sucrose-Konzentration bestätigt. Die Temperatur per se hatte keinen bedeutenden Einfluss auf die Expression, wie Expressionsstudien unter niedrigen osmotischen Bedingungen zeigten. Aber in Kombination mit hoher Osmolarität erwies sich die Expression als temperaturabhängig. Die durch höhere Temperaturen bedingte Modifizierung der DNA-Struktur von Promotoren wurde als physikalische Verstärkung der transkriptionellen Aktivierung beschrieben (Lambert de Rouvroit et al. 1992) und könnte auch im Falle des *esp*-Operons einen verstärkenden Einfluss bewirken. Die natürliche Infektionsroute von EHEC beinhaltet sowohl niedrige osmotische Bedingungen und meist niedrige Temperaturen außerhalb des Wirtes wie auch den kurzen Aufenthalt in saurem Milieu (Magenpassage), gefolgt von alkalischem und am Infektionsort neutralem bis leicht alkalischem pH-Wert, sowie hohe Osmolarität und Temperaturen um 37°C. Die Expression der Virulenzfaktoren innerhalb des Wirtes könnte also auch in Abhängigkeit eines bestimmten pH-Werts induziert werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Expression des *esp*-Operons nicht in Antwort auf einen bestimmten pH-Wert erfolgte.

Während der Passage von EHEC durch den Magen wird wahrscheinlich das Wachstum herunterreguliert. Im Intestinaltrakt findet das Pathogen jedoch optimale Bedingungen, um das Wachstum erneut anzuregen. Dadurch befindet sich EHEC im Darm des Wirtes in der frühen logarithmischen Phase. Mit der Stimulation nahrungsreicher, pH-Wert und Temperatur optimierter Bedingungen durch LB-Medium wurde die Hypothese einer Expression des *esp*-Operons in der frühen logarithmischen Phase unterstützt. Allerdings ist die Wachstumsphase allein nicht ausreichend, wie Versuche in Minimalmedium zeigten.

Ein klar definiertes Medium ist das Zellkulturmedium, in dem EHEC und EPEC verstärkt Proteine sekretieren (Kenny und Finlay, 1995; Ebe et al. 1996), und es ist vermutet worden, dass bestimmte Komponenten des Zellkulturmediums die Expression der Proteine induzieren. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Sekretion der Proteine wahrscheinlich eine Beobachtung *in vitro* ist und *in vivo* die Proteine zu hochmolekularen Oberflächenstrukturen aufgebaut bzw. gezielt in die Wirtszelle translokiert werden. Die Induktion des *esp*-Operons war nur dann durch β -Galaktosidase-Studien nachzuweisen, wenn HEPES dem Medium beigelegt war. Dies erklärt die erhöhte Sekretionsrate in HEPES-gepufferten Medien, nicht jedoch die beobachtete Sekretion der *Esp*-Proteine in Medien ohne HEPES. Andere Komponenten mit induzierender Wirkung auf die Expression des *esp*-Operons waren Mn^{2+} und Ca^{2+} . Mn^{2+} ist in der Regulation der Expression von Metall-Transporter-Systemen in *Streptococcus* und *Yersinia* involviert (Dintilhac et al. 1997; Bearden et al. 1998). Ca^{2+} spielt vielfach eine bedeutende Rolle in der Regulation von Virulenzgenen aus verschiedenen pathogenen Mikroorganismen (Puente et al. 1996; Mekalanos, 1992; Kenny et al. 1997a), und für *Yersinia* wurde ein Ca^{2+} -Regulator identifiziert, der an der Oberfläche der Bakterien exponiert ist (Galán et al. 1992). In den LEE-Sequenzen von EHEC und EPEC gibt es allerdings kein Homologon zu *YopN*. Der Einfluß von Ca^{2+} belief sich von der frühen bis mittleren logarithmischen Phase und resultierte in einer starken Expression des *esp*-Operons. Während also der von Ismaili et al. postulierte Einfluß von intrazellulärem Ca^{2+} auf die cytoskeletale Reorganisation nach Signaltransduktion in der eukaryontischen Zelle (Ismaili et al. 1995) durch neuere Untersuchungen in Frage gestellt wird (Bain et al. 1998), erfährt diese divalente Kation eine Bedeutungsbeimessung in der Expression von Virulenzfaktoren aus EHEC, die zur Signaltransduktion essentiell sind.

β -Galaktosidase-Studien mit einer *rpoS*-Mutante zeigten, dass die Expression des *esp*-Operons durch σ^S reguliert wird. Hierdurch wurde die gefundene -10-Sequenz mit Homologien zum *osmE*-Promotor bestätigt. In geringem Maße war das *esp*-Operon trotz des Fehlens von σ^S durch eine hohe Osmolarität induzierbar. σ^S ist dafür bekannt, die Regulation in der stationären Phase oder als Antwort auf einen osmotischen Schock einzuleiten (Hengge-Aronis et al. 1993; Hengge-Aronis, 1996). Aber die Expression schien nicht allein σ^S -abhängig zu sein. Tanaka et al. (Tanaka et al. 1993) zeigten, dass einige Promotoren sowohl durch das σ^S - als auch durch das σ^{70} -Holoenzym der RNA-Polymerase erkannt werden können. Somit steht die Expression des *esp*-Operons nicht nur in Abhängigkeit von σ^S , sondern kann auch durch σ^{70} induziert werden. Hierfür spricht auch die Homologie der -10-Sequenz zum *bfpA*-Promotor, für den die Expression durch σ^{70} vorgeschlagen worden ist (Puente et al. 1996).

H-NS ist ein globaler negativer Regulator, der in die Expression von Virulenzfaktoren vieler pathogener Mikroorganismen eingreift (Porter und Dorman, 1994; Dorman, 1991; Atlung und Ingmer, 1997). In einer *hns*-Mutante konnte eine 10-20fache De-Repression des *esp*-Operons nachgewiesen werden. Dies könnte durch die Überexpression des de-reprimierten σ^S in dieser Mutante (Atlung und Ingmer, 1997) begründet werden. H-NS greift aber auch in weiter unten liegende Ebenen von Regulationskaskaden ein und bindet hierbei an spezifische Erkennungssequenzen (Rimsky und Spassky, 1990), die auch in der Promotorregion des *esp*-Operons detektiert wurden. Durch die Studien an einer β -Galaktosidase-Fusion, der dieser potentielle H-NS-Bindungsereich fehlte, konnte die Vermutung des direkten Eingriffs von H-

NS belegt werden. Die β -Galaktosidase-Fusion ohne H-NS-Bindungsstelle wies trotz des Vorliegens in einem *hns*-positiven *E. coli*-Stamm eine 10fache De-Repression des *esp*-Operons auf.

8. Schlussfolgerung: ein neues 4-Stufen-Modell für Infektionen von Epithelzellen mit EHEC

Bei Infektionen von EHEC und EPEC an Epithelzellen gehen mehrere Schritte voraus, die die Wirtszelle für eine enge Adhäsion der Bakterien vorbereiten. Frühere Modelle für die Abfolge der Infektion mit EPEC (Rosenshine et al. 1996b; Donnenberger et al. 1992) sahen vor, dass BFP die initiale Bindung an die Wirtszelle bewirkten. Eine darauf folgende Sekretion von Esp-Proteinen sollte eine Signaltransduktion in der Zielzelle auslösen, die u.a. eine Tyrosin-Phosphorylierung eines Wirtsproteins und die cytoskeletale Umstrukturierung der Zelle bewirken sollte (Rosenshine et al. 1992a). Die letzte Stufe dieses Modells sah die enge Bindung der Bakterien mittels Intimin und die Akkumulation von Aktin unterhalb der Bakterien vor (Jerse und Kaper, 1991). Wie dieses Modell ignorierte auch ein 1998 von Hicks et al. vorgeschlagenes Schema, dass EHEC trotz des Fehlens von BFP in der Lage ist, einen A/E-Phänotyp auszuprägen. Darüber hinaus zeigten McDaniel und Kaper 1997, dass für die Bildung von A/E-Läsionen die gesamte Information auf dem LEE kodiert vorliegt (McDaniel und Kaper, 1997). Zwar besteht die Möglichkeit, dass EPEC in einer ersten lockeren Bindung an die Epithelzellen auch die BFP einsetzen könnte (s. Abb. 4), aber es muss weitere Adhäsionsfaktoren auf dem LEE geben, die eine für die Initialbindung genügen. Ebenso ist die Hypothese nicht haltbar, dass eine Tyrosin-Phosphorylierung des Intimin-Rezeptors notwendig ist (Kenny et al. 1997), da viele EHEC-Stämme diese Phosphorylierung nicht durchführen.

Die Analyse des ausgewählten Sequenzbereiches des LEE aus EHEC und EPEC hat ergeben, dass die darin kodierten Proteine EspA, EspD und EspB maßgeblich an der Ausprägung der A/E-Läsionen beteiligt sind. Dabei konnte die Vorstellung revidiert werden, dass diese Virulenzfaktoren bei Kontakt mit Wirtszellen lediglich in das Medium ausgeschleust werden (Hicks et al. 1998). Vielmehr fungiert das Typ III Sekretionssystem als Biosyntheseapparat für einen Pili-ähnlichen Translokationskanal, der aus EspA und möglicherweise noch anderen Strukturproteinen besteht (EspA-Filament). Dieser Translokationskanal ist notwendig für die Insertion von EspB und EspD in die Cytoplasmamembran der Wirtszelle. EspB und EspD wiederum sind notwendig, um eine Aktinakkumulation oder bei EPEC eine Tyrosin-Phosphorylierung von Tir durchzuführen. Möglicherweise bilden EspB und EspD einen Translokationskomplex, der in der fortlaufenden Infektion die Translokation von EspE/Tir in die Wirtsmembran ermöglicht und weitere bis jetzt unbekannte Faktoren in die Zielzelle einschleust. Durch die Fähigkeit der EspA-Filamente, einen Kontakt zur Wirtszelle zu etablieren, ohne dass eine enge Anlagerung des Bakteriums an die Zelle gegeben ist, wird indiziert, dass diese EspA-Filamente allein bereits eine Initialbindung ermöglichen. Für EHEC sind diese Filamente auch gleichzeitig das Medium, das interbakterielle Kontakte ermöglicht und so wahrscheinlich (mit) verantwortlich für die Bildung von Mikrokolonien sind.

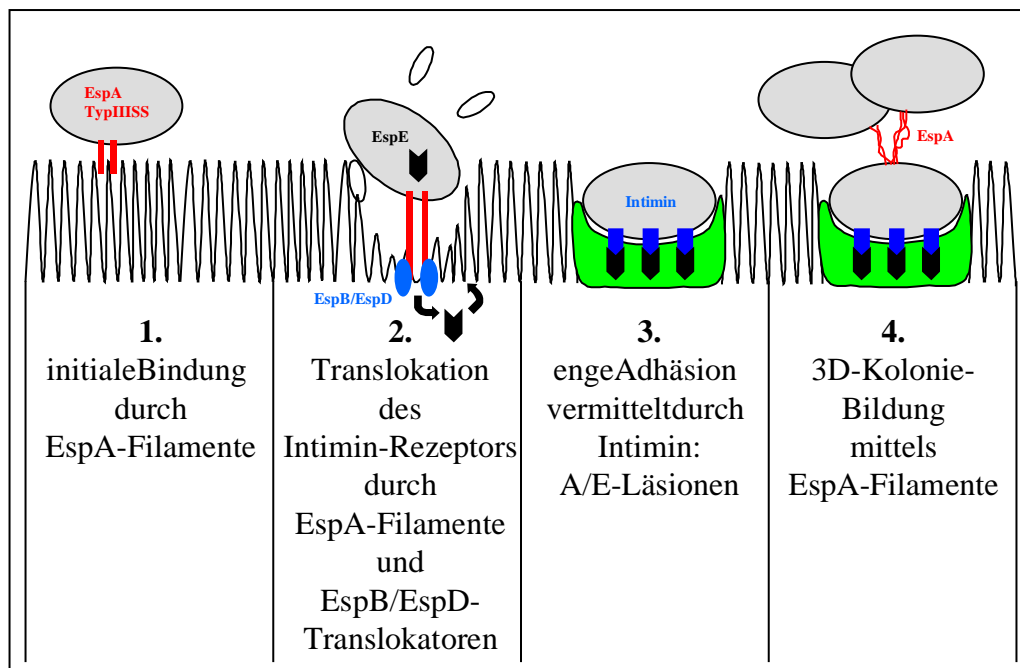


Abb. 82: 4-Stufenmodell der Adhäsion von EHEC an Epithelzellen (modifiziert nach Hick et al. 1998). (1) Die initiale Bindung von EHEC an eukaryontische Epithelzellen erfolgt mit Hilfe von EspA-Filamenten. (2) EHEC inseriert EspB und EspD in die Wirtszellmembran, wo diese als Translokatoren für sich und andere Effektoren fungieren. Der Intimin-Rezeptor EspE wird ebenfalls über den EspA/EspB/EspD-Translokator in die Wirtszelle translokiert. Möglicherweise sind bereits in diesem Stadium Effektoren an der Reorganisation des Cytoskelets beteiligt. (3) Die enge Anbindung der Bakterien erfolgt über die EspE-Intimin-Bindung und es kommt zur phänotypischen Ausprägung des A/E. Eine Tyrosin-Phosphorylierung von EspE ist nicht notwendig für eine stabile Intimin-Rezeptor-Bindung. EspE dient gleichsam als Nukleator zur Aktinakkumulation, was zur Ausbildung von *pedestals* und seltener zur Invasion der Bakterien führt. (4) Die EspA-Filamente sind auch in der Quervernetzung der adhärenen Bakterien unter Bildung dreidimensionaler Mikrokolonien beteiligt.

9. Aussichten: Bekämpfung von EHEC-Infektionen

Die Neuentdeckung eines hochkontagiösen *E. coli*-Stammes und die Vehemenz zahlreicher Ausbrüche haben weltweit für Interesse an Präventionsmaßnahmen gegen EHEC geweckt. Doch EHEC bedingte Infektionen verlaufen i. d. R. schnell, und zum Zeitpunkt der Diagnose ist meist die Möglichkeit einer therapeutischen Abwehr nicht mehr gegeben. Die direkte Bekämpfung von EHEC wird durch die Vielzahl antibiotika-resistenter Stämme und vor allem durch das Risiko einer Komplikation des Krankheitsverlaufs wegen der Freisetzung von STx bei der Vergabe von Antibiotika erschwert. Eine EHEC-Infektion muss daher symptomatisch behandelt werden. Die Vorbeugung von EHEC-Infektionen wird z. Z. durch die Herstellung von Vakzinenerprobt, die auf dem serotypischen LPS von EHEC O157 basieren (Konadu et al. 1998). Diese Bemühungen sind allerdings weltweit ohne Belang, weil durch die Vakzinierung gegen einen Serotyp der Rahmen der EHEC-Bekämpfung zu eng gesteckt wird. Es gibt über 200 Serotypen, und in vielen Ländern bilden andere Serotypen von EHEC die größten Probleme. Das sich EPEC und EHEC in dem von ihnen verursachten Pathogenitätsprozess stark ähneln – weil sie eine z. T. stark

homologe Pathogenitätsinsel beherbergen - und da überdies noch weitere enteropathogene Bakterien (*Citrobacter*, *Hafnia*, DAEC) ebenfalls über einen LEE verfügen und das A/E auslösen, sollte möglicherweise angedacht werden, ob eine kombinierte Vakzinierung gegen diese Pathogene auf der Grundlage konservierter Faktoren des LEE durchführbar ist. Alle genannten Pathogene enthalten Intimin, das eine starke Immunantwort hervorruft. Die Lokalisation auf der Oberfläche und die absolute Notwendigkeit dieses Adhäsins für die Kolonisierung der Bakterien eröffnet eine "Achillesferse", die in Kombination mit anderen Antigenen eine gute Gelegenheit zur erfolgreichen Immunisierung bieten sollte. Diese Arbeit hat gezeigt, dass EspA ein weiteres Antigen ist, das für den Zeitraum der Besiedlung von EHEC durch die Ausbildung zu Filamenten eine große Angriffsfläche für das Immunsystem bieten sollte. Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper gegen EspA reagierten sowohl gegen EspA aus EHEC EDL933 als auch gegen EspA aus EPEC E2348/69. Zumindest für EHEC, EPEC und DAEC sollten die Homologien dieses Proteins hoch genug sein, um die durch Vergabe von EspA eines Stammes die Produktion spezifischer Antikörper gegen alle drei pathogene *E. coli* zu induzieren. SepL wurde als ein weiteres Oberflächenprotein von EHEC bestimmt, das durch den LEE kodiert wird und das für die Infektion mit EHEC notwendig ist. Dieses Protein ist in den bekannten LEE-Sequenzen stark konserviert, und somit bietet sich möglicherweise auch dieses Protein als ein gutes Ziel für Immunisierungen an.

Die Aufklärung von Aspekten des Pathogenitätsprozesses von EHEC sowie der ihnen unterliegenden Regulationsmechanismen könnten zu neuen Alternativen in der therapeutischen Intervention und Prävention von EHEC-Infektionen führen. Dabei sind die Identität und Eigenschaften der eingesetzten Faktoren und die Art ihrer Präsentation ebenso wichtig wie das Verständnis über die zeitliche Expression innerhalb der Infektion, um in einer möglichst frühen Phase der Infektion die Virulenz zu blockieren. Mit der Kenntnis um die Virulenzfaktoren pathogener Organismen ergibt sich auch die Möglichkeit zur Abschätzung potentieller Zielfaktoren für die Erzeugung attenuierter Impfstoffe und Trägerstämme. Um eine maximale Immunantwort gegen enteropathogene Bakterien zu erhalten, sollte die Vakzine oral verabreicht und vorzugsweise in Form replizierender Bakterien dargereicht werden (Lindberg, 1998). Die zu EPEC und STEC verwandten REPEC adhärieren an M-Zellen der Peyer'schen Platten (von Moll und Cantey, 1997). Sollten EPEC ebenfalls an M-Zellen binden, so könnten sich attenuierte EPEC-Stämme als Impfstoff-Vektoren überaus eignen, da sie fest an die Zielzellen adhärieren, durch eine gemäßigte Invasivität auch die basolateral situierten Zellen des Immunsystems erreichen würden und weilsie das komplette System beherbergen, um Antigene wie Intimin, EspA oder SepL zu exprimieren und zu präsentieren. In Anlehnung an attenuierte *Salmonella*-Trägerstämme sollte eine Attenuation von EPEC erzielbar sein, ohne die wichtigen Eigenschaften der Adhärenz und Invasion zu verlieren. Somit stünde der Weg offen für eine neue Generation von Impfstoffen, die oral verabreichbar ist und eine Vielzahl enteropathogener Mikroorganismen zugleich betrifft.

Referenzen

- Abe, A., Kenny, B., Stein, M. und Finlay, B.B. (1997) Characterization of two virulence proteins secreted by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*, EspA and EspB, whose maximal expression is sensitive to host body temperature. *Infect. Immun.* **65**:3547-3555.
- Acheson, D.W. und Teusch, G.T. (1996) Which Shiga toxin-producing types of *E. coli* are important? *ASM News* **62**:302-306.
- Agin, T.S. und Wolf, M.K. (1997) Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. *Infect. Immun.* **65**:320-326.
- Akerley, J.F., Cotter, P.A. und Miller, J.F. (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the Bordetella-host interaction. *Cell* **80**:611-620.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D. (1997) *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Aufl. Weinheim: VCH.
- Altekruse, S.F., Cohen, M.L. und Swerdlow, D.L. (1997) Emerging foodborne diseases. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol3no3/cohen.htm3>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990) Basis local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Anderson, D.A. und Schneewind, O. (1997) An mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**:1140-1143.
- Anderson, D.A. und Schneewind, O. (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion. *Mol. Microbiol.* **31**:1139-1148.
- Appel, R.D., Bairoch, A. und Hochstrasser, D.F. (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* **19**:258-260.
- Atlung, T. und Ingmer, H. (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **24**:7-17.
- Ausubel (1995) *Short protocols in molecular biology*. 3. Aufl. Wiley und Sons, Inc.
- Bain, C., Keller, R., Collington, G.K., Trabulsi, L.R. und Knutton, S. (1998) Increased levels of intracellular calcium are not required for the formation of attaching and effacing lesions by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **66**:3900-3908.
- Bajaj, V., Lusas, R.L., Hwang, C. und Lee, C.A. (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol.* **22**:703-714.
- Baldini, M.M. und Kaper, J.B. (1983) Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2**:534-538.
- Baldwin, T.J., Ward, W., Aitken, A., Knutton, S. und Williams, P.H. (1991) Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**:1599-1604.
- Bastian, S.N., Carle, I. und Grimont, F. (1998) Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **149**:457-472.
- Baudry, B., Kaczorek, M. und Sansonetti, P. (1988) Nucleotide sequence of the invasion plasmid antigen B and C genes (*ipaB* and *ipaC*) of *Shigella flexneri*. *Microb. Pathog.* **4**:345-357.
- Bauer, M.E. und Welch, R.A. (1996) Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **64**:167-175.
- Bean, N.H., Goulding, J.S., Lao, C. und Angulo, F.J. (1996) Surveillance for foodborne disease outbreaks. *Morb. Mortal Wkly. Rep.* **45**:1-66.
- Bearden, S.W., Staggs, T.M. und Perry, R.D. (1998) An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. *J. Bacteriol.* **180**:1135-1147.

- Beebakhee, G., Louie, M., de Azavedo, J. und Brunton, J. (1992) Cloning and nucleotide sequence of the eae gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:(1):63-68.
- Beinke, C., Laarmann, S., Wachter, C., Karch, H., Greune, L. und Schmidt, M.A. (1998) Diffusely adhering *Escherichia coli* strains induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of Esp proteins. *Infect. Immun.* **66**:528-539.
- Beltrametti, F., Kresse, A.U. und Guzmán, C.A. (1999) Transcriptional Regulation of the *esp* Genes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:3409-18.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L. und Weintraub, H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**:49-59.
- Beutin, L., Aleksic, S., Bockemuehl, J., Schwarzkopf, A. und Karch, H. (1994) Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1993. *Bundesgesundhbl.* **10**:410-414.
- Beutin, L., Geier, D., Steinrueck, H., Zimmermann, S. und Scheut, F. (1993) Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* **31**:2483-2488.
- Beutin, L., Montenegro, M.A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S. und Stephan, R. (1989) Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2559-2564.
- Beutin, L. und Niemer, U. (1995) Erkennung, Verhütung und Bekämpfung von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). *Bundesgesundhbl.* **11**:422-427.
- Binet, R., Létoffé, S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P. und Wandersman, C. (1997) Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters: a review. *Gene* **192**:7-11.
- Blattner, F.R., Plunkett III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M., Rose, D., Mau, B. und Shao, Y. (1997) The complete sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1462.
- Bockemuehl, J. und Karch, H. (1996) Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995). *Bundesgesundhbl.* **8**:290-296.
- Bockemuehl, J., Karch, H. und Tschaep, H. (1997) Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. *Bundesgesundhbl.* **6**:194-197.
- Bogdanove, A.J., Wei, Z.M., Zhao, L. und Beer, S.V. (1996) *Erwinia amylovora* secretes harpin via a type III pathway and contains a homolog of yopN of *Yersinia* spp. *J. Bacteriol.* **178**:1720-1730.
- Boyd, E.F., Nelson, K., Wang, F.-S., Whittam, T.S. und Selander, R.K. (1994) Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (*mdh*) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1280-1284.
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. und Arnold, H.H. (1989) A novel muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* **8**:701-709.
- Brunder, W., Schmidt, H. und Karch, H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* **24**:767-778.
- Burrige, K., Nuckolls, G., Otey, C., Pavalko, F., Simon, K. und Turner, C. (1990) Actin-membrane interaction in focal adhesions. *Cell Differ. Dev.* **32**:337-342.
- Canil, C., Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. und Finlay, B.B. (1993) Enteropathogenic *Escherichia coli* decreases the transepithelial electrical resistance of polarized epithelial monolayers. *Infect. Immun.* **61**:2755-2762.
- Carpenter, P.B., Zuberi, R. und Ordal, G.W. (1993) *Bacillus subtilis* flagellar proteins FliP, FliQ, FliR, and FlhB are related to *Shigella flexneri* virulence factors. *Gene* **137**:243-245.

- Cassin, M.H., Lammerding, A.M., Todd, E.C., Ross, W. und McColl, R.S. (1998) Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int. J. Food Microbiol.* **41**:21-44.
- Charkowski, A.O., Huang, H.C. und Collmer, A. (1997) Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hrp mutant suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **179**:3866-3874.
- Chart, H., Scotland, S.M. und Rowe, B. (1989) Serum antibodies to *Escherichia coli* serotype O157:H7 in patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **27**:285-290.
- Claros, M.G. und von Heijne, G. (1994) Prediction of transmembrane segments in integral membrane proteins, and the putative topologies, using several algorithms. *CABIOS* **10**: 685-686.
- Collazo, C.M. und Galán, J.E. (1996) Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**: 3524-3531.
- Collazo, C.M. und Galán, J.E. (1997) Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Molecular Microbiology*. **15**:25-38.
- Collins, J.L., Small, M.L., Kann, L., Pateman, B.C., Gold, R.S. und Kolbe, L.J. (1995) School health education. *J. Sch. Health* **65**:302-311.
- Conter, A., Menchon, C. und Gutierrez, C. (1997) Role of DNA supercoiling and RpoS sigma factor in the osmotic and growth phase-dependent induction of the gene *osmE* of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **273**:75-83.
- Cornelis, G.R. und Wolf-Watz, H. (1997) The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **23**:861-867.
- Cravioto, A., Reyes, R.E., Ortega, R., Fernandez, G., Hernandez, R. und Lopez, D. (1988) Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidemiol. Infect.* **101**:123-134.
- Davis, B.R., Weintraub, H. und Lassar, A.B. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**:987-1000.
- Davis, R.W., Botstein, D. und Roth, J.R. (1980) *Advanced bacterial genetics, a manual for genetic engineering*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. und Timmis, K.N. (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq*/*P*_{trp}-*lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**:17-24.
- Dean-Nystoc, E.A., Bosworth, B.T., Cray, W.C. und Moon, H.W. (1997) Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect. Immun.* **65**:1841-1848.
- Deibel, C., Kramer, S., Chakraborty, T. und Ebel, F. (1998) EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. *Mol. Microbiol.* **28**:463-474.
- Delazari, I., Iaria, S.T., Riemann, H.P., Cliver, D.O. und Mori, T. (1998) Decontaminating beef for *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* **61**:547-550.
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C. und Claverys, J. (1997) Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: *Adc* and *PsaA* mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* **25**:727-739.
- Djafari, S., Ebel, F., Deibel, C., Kramer, S., Hudel, M. und Chakraborty, T. (1997) Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **25**:771-784.
- Donnenberg, M.S., Donohue Rolfe, A. und Keusch, G.T. (1990) A comparison of HEp-2 cell invasion by enteropathogenic and enteroinvasive *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 83-86.

- Donnenberg, M.S., Giròn, J.A., Nataro, J.P. und Kaper, J.B. (1992) A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol. Microbiol.* **6**:3427-3437.
- Donnenberg, M.S., Lai, L.C. und Taylor, K.A. (1997) The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes secretion functions and remnants of transposons at its extreme right end. *Gene* **184**:107-114.
- Donnenberg, M.S., Tzipori, S., McKee, M.L., O'Brien, A.D., Alroy, J. und Kaper, J.B. (1993a) The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model [see comments]. *J. Clin. Invest.* **92**:1418-1424.
- Donnenberg, M.S., Yu, J. und Kaper, J.B. (1993b) A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J. Bacteriol.* **175**:4670-4680.
- Donohue-Rolfe, A. und Keusch, G.T. (1983) *Shigella dysenteriae* 1 Cytotoxin: Periplasmic protein releasable by Polymyxin B and osmotic shock. *Infect. Immun.* **39**:270-274.
- Dorman, C.J. (1991) DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect. Immun.* **59**:745-749.
- DuPont, H.L., Levine, M.M., Hornick, R.B. und Formal, S.B. (1989) Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.* **159**:1126-1128.
- Ebel, F., Deibel, C., Kresse, A.U., Guzmán, C.A. und Chakraborty, T. (1996) Temperature- and medium-dependent secretion of proteins by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**:4472-4479.
- Ebel, F., Podzadel, T., Rohde, M., Kresse, A.U., Kramer, S., Deibel, C., Guzmán, C.A. und Chakraborty, T. (1998) Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol. Microbiol.* **30**:147-161.
- Eberhart-Phillips, J., Besser, R.E., Tormey, M.P., Feikin, D., Araneta, M.R. und Wells, J. (1996) An outbreak of cholera from food served on an international aircraft. *Epidemiol. Inf.* **116**:9-13.
- Economou, A. und Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**:835-843.
- Elliott, J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y., Lai, L.C., McNamara, B.P., Donnenberg, M.S. und Kaper, J.B. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* **28**:1-4.
- Emerson, S.U., Tokuyasu, K. und Simon, M.I. (1970) Bacterial flagella: polarity of elongation. *Science* **169**:190-192.
- Fang, F.C., Libby, J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala, J., Harwood, J. und Guiney, D.G. (1992) The alternative sigma factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:11978-11982.
- Fath, M.J. und Kolter, R. (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**:995-1017.
- Finelli, L., Swerdlow, D.L., Mertz, K., Ragazzoni, H. und Spitalny, K. (1992) Outbreak of cholera associated with crabs brought from an area with epidemic disease. *J. Infect. Dis.* **166**:1433-1436.
- Finlay, B.B. und Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:136-139.
- Finlay, B.B., Rosenshine, I., Donnenberg, M.S. und Kaper, J.B. (1992) Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect. Immun.* **60**:2541-2543.

- Foubister, V., Rosenshine, I. und Finlay, B.B. (1994) A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J. Exp. Med.* **179**:993-998.
- Francis, C.L., Jerse, A.E., Kaper, J.B. und Falkow, S. (1991) Characterization of interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 with mammalian cells in vitro. *J. Infect. Dis.* **164**: 693-703.
- Francis, M.S. und Wolf Watz, H. (1998) YopD of *Yersinia pseudotuberculosis* is translocated into the cytosol of HeLa epithelial cells: evidence of a structural domain necessary for translocation. *Mol. Microbiol.* **29**:799-813.
- Frankel, G., Candy, D.C., Fabiani, E., Adu Bobie, J., Gil, S., Novakova, M., Phillips, A.D. und Dougan, G. (1995) Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:4323-4328.
- Frankel, G., Lider, O., Hershkovich, R., Mould, A.P., Kachalsky, S.G., Candy, D.C.A., Cahalon, L., Humphries, M.J. und Dougan, G. (1996) The cell-binding domain of intimins from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to β 1 integrins. *J. Biol. Chem.* **271**:20359-20364.
- Galán, J.E. (1996) Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**:263-271.
- Galán, J.E. (1997) Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**:221-255.
- Galán, J.E., Ginocchio, C. und Costeas, P. (1992) Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* **174**:4338-4349.
- Gallien, P., Richter, H., Klie, H., Timm, M., Karch, H., Perlberg, K.W., Steinruck, H., Riemer, S., Djuren, M. und Protz, D. (1997) Detection of STEC and epidemiological investigations in surrounding of a HUS patient. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **110**:342-346.
- Gannon, V.P., Rashed, M., King, R.K. und Thomas, E.J. (1993) Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest.* **31**:1268-1274.
- Garnier, J., Gibrat, J.F. und Robson, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.* **266**:540-553.
- Gilgen, M., Hubner, P., Hofelein, C., Luthy, J. und Candrian, U. (1998) PCR-based detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in ground beef. *Res. Microbiol.* **149**: 145-154.
- Ginocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C.L. und Galán, J.E. (1994) Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* **76**:717-724.
- Girón, J.A., Ho, A.S. und Schoolnik, G.K. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**:710-713.
- Gomez Duarte, O.G. und Kaper, J.B. (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:1767-1776.
- Goodson, M. und Rowbury, R.J. (1989) Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**:77-79.
- Goosney, D.L., Celli, J., Kenny, B. und Finlay, B.B. (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. *Infect. Immun.* **67**:490-495.
- Gorden, J. und Small, P.L.C. (1993) Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* **61**:364-367.
- Grand, R.J. (1989) Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochem. J.* **258**:625-638.
- Greater, J.S. und Thorne, G.M. (1994) Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1172-1178.

- Grif, K., Dierich, M.P. und Allerberger, F. (1998) Dynabeads plus 3 MPetrifilm HEC versus Vitek Immunodiagnostic Assay System for detection of *E. coli* O157 in minced meat. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**:199-204.
- Griffin, P.M. und Tauxe, R. V. (1991) The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* **13**:60-98.
- Gunzburg, S. T., Tornieporth, N. G. und Riley, L. W. (1995) Identification of enteropathogenic *Escherichiacoli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1375-1377.
- Hahn, H., Falke, D. und Klein, P. (1994) Medizinische Mikrobiologie. 2. Aufl., Springer Verlag Berlin Heidelberg:
- Hakansson, S., Galyov, E.E., Rosqvist, R. und Wolf Watz, H. (1996a) The Yersinia YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol. Microbiol.* **20**:593-603.
- Hakansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E.E., Rosqvist, R., Homble, F. und Wolf Watz, H. (1996b) The YopB protein of Yersinia pseudotuberculosis is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBOJ.* **15**:5812-5823.
- Hall, G.A. und Reynolds, D.J. (1985) Dysentery caused by *Escherichiacoli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease. *Vet. Pathol.* **22**:156-163.
- Harrison, S.C. und Aggarwal, A.K. (1990) DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* **59**:933-969.
- He, S.Y. (1997) Hrp-controlled interkingdom protein transport: learning from flagellar assembly? *Trends Microbiol.* **5**:489-495.
- Hengge-Aronis, R. (1996) Back to log phase: ss as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichiacoli*. *Mol. Microbiol.* **21**:887-893.
- Hengge-Aronis, R., Lange, R., Henneberg, N. und Fisher, D. (1993) Osmotic regulation of rpoS-dependent genes in *Escherichiacoli*. *J. Bacteriol.* **175**:259-265.
- Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**:351-359.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M. und Wallace, C.J. (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6602-6606.
- Henikoff, S. und Henikoff, J.G. (1994) Protein family classification based on searching a database of blocks. *Genomics* **19**:97-107.
- Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C. und Holden, D.W. (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* **30**:163-174.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. und Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.
- Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J.B., Dougan, G. und Phillips, A.D. (1998) Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichiacoli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect. Immun.* **66**:1570-1578.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. und Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379-433.
- Hulton, C.S.J., Seirafi, A., Hinton, J.C.D., Sidebotham, J.M., Wadel, L., Pavit, G.D., Owen-Hughes, T., Spassky, A., Buc, H. und Higgins, C.F. (1990) Histone like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell* **63**:631-642.

- Ismaili, A., McWhirter, E., Handelsman, M.Y., Brunton, J.L. und Sherman, P.M. (1998) Divergent signal transduction responses to infection with attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **66**:1688-1696.
- Ismaili, A., Philpott, D.J., Dytoc, M.T. und Sherman, P.M. (1995) Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **63**: 3316-3326.
- Jarvis, K.G., Giròn, J.A., Jerse, A.E., McDaniel, T.K., Donnenberg, M.S. und Kaper, J.B. (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**:7996-8000.
- Jarvis, K.G. und Kaper, J.B. (1996) Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect.Immun.* **64**:4826-4829.
- Jerse, A.E. und Kaper, J.B. (1991) The *eaeA* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Inf.Immun.* **59**: 4302-4309.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. und Kaper, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**:7839-7843.
- Johnson, R.P., Clarke, R.C., Wilson, J.B., Read, S.C., Rahn, K., Renwick, S.A., Sandhu, K.A., Alves, D., Karmali, M.A. und Lior, H. (1996) Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Protect.* **59**: 1112-1122.
- Jones, C.J., Homma, M. und Macnab, R.M. (1989) L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J. Bacteriol.* **171**:3890-3900.
- Jungnitz, H., West, N.P., Walker, M.J., Chhatwal, G.S. und Guzmán, C.A. (1998) A second two component regulatory system of Bordetella bronchiseptica required for bacterial resistance in vitro to oxidative stress, production of acid phosphatase and in vivo persistence. *Inf.Immun.* **66**: 4640-4650.
- Kaniga, K., Delor, I. und Cornelis, G.R. (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137-141.
- Kaper, J.B. (1998) Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr.Op.Microbiol.* **1**:103-108.
- Karch, H., Heesemann, J., Laufs, R., Kroll, H.P., Kaper, J.B. und Levine, M.M. (1987) Serological response to type 1-like somatic fimbriae in diarrheal infection due to classical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microb.Pathog.* **2**:425-434.
- Karmali, M.A. (1989) Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol. Rev.* **2**:15-38.
- Karmali, M.A. und Petric, M. (1994) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to *Escherichia coli* Vero cytotoxin 1. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1457-1463.
- Keene, W.E., McAnulty, J.M. und Hoesly, F.C. (1994) A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N.Eng.J.Med.* **331**:579-584.
- Kenny, B. (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol.Microbiol.* **31**:1229-1241.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M. und Finlay, B.B. (1997a) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect.Immun.* **65**:2606-2612.

- Kenny, B., De Vinney, R., Stein, M., Reinsheid, J., Frey, E.A. und Finlay, B.B. (1997b) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence to mammalian cells. *Cell* **91**:511-520.
- Kenny, B. und Finlay, B.B. (1995) Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 7991-7995.
- Kenny, B. und Finlay, B.B. (1997c) Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *Infect. Immun.* **65**:2528-2536.
- Kenny, B., Lai, L.C., Finlay, B.B. und Donnenberg, M.S. (1996) EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **20**:313-323.
- Knehl, E. (1997) Hämolytisch-urämisches Syndrom durch *E. coli* O157: Laborinfektion. *Der Mikrobiologe* **7**:32.
- Knutton, S., Adu-Bobie, J., Bain, C., Phillips, A.D., Dougan, G. und Frankel, G. (1997) Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* lesion. *Infect. Immun.* **65**:1644-1652.
- Knutton S., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, I., Neves, B.C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G. und Frankel, G. (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* **17**: 2166-2176.
- Konadu, E. Y., Parke, J.C., Tran, H.T., Bryla, D.A., Robbins, J.B. und Szu, S.C. (1998) Investigational vaccine for *Escherichia coli* O157: phase 1 study of O157 O-specific polysaccharide-*Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A conjugates in adults. *J. Infect. Dis.* **177**:383-387.
- Kresse, A.U., Schulze, K., Deibel, C., Ebel, F., Rohde, M., Chakraborty, T. und Guzmán, C.A. (1998) Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:4370-4379.
- Kuwajima, G., Kawagishi, I., Homma, M., Asaka, J., Kondo, E. und Macnab, R.M. (1989) Export of N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum-specific pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4953-4957.
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
- Lai, L.C., Wainwright, L.A., Stone, K.D. und Donnenberg, M.S. (1997) A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect. Immun.* **65**:2211-2217.
- Lambert de Rouvroit, C., Sluiters, C. und Cornelis, G.R. (1992) Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **6**:395-409.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. und McKnight, S.L. (1988) The Leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.
- Lange, R. und Hengge-Aronis, R. (1991) Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor σ_{24} . *J. Bacteriol.* **173**:4474-4481.
- Lee, C.A. (1997) Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol.* **5**:148-156.
- Lee, L.A., Puhr, N.D., Maloney, E.K., Bean, N.H. und Tauxe, R.V. (1994) Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States. *J. Infect. Dis.* **170**:18-34.

- Levine, M.M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:377-389.
- Levine, M.M., Nataro, J.P., Karch, H., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Clements, M.L. und O'Brien, A.D. (1985) The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J. Infect. Dis.* **152**:550-559.
- Lewin, B. (1991) *Gene*. 2. Aufl. Weinheim: VCH.
- Leyer, G.J., Wang, L.L. und Johnson, E.A. (1995) Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3752-3755.
- Lindberg, A.A. (1998) Vaccination against enteric pathogens: from science to vaccine trials. *Curr. Op. Microbiol.* **1**:116-124.
- Lindl, T. und Bauer, J. (1994) Zell- und Gewebekultur. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*. 68
- Lingwood, C.A. (1994) Verotoxin-binding in human renal sections. *Nephron* **66**:21-28.
- Lingwood, C.A. (1996) Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends. Microbiol.* **4**:147-153.
- Louise, C.B. und Obrig, T.G. (1995) Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **172**:1397-1401.
- Lupas, A., van Dycke, M. und Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**:1162-1164.
- Macnab, R.M. (1992) Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Ann. Rev. Genet.* **26**:131-158.
- Manchester, A. und Clauson, A. (1995) 1994 spending for food away from home outpaces food at home. *Food Rev.* **18**:12-15.
- Manjarrez Hernandez, H.A., Baldwin, T.J., Aitken, A., Knutton, S. und Williams, P.H. (1992) Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Lancet* **339**:521-523.
- Matthews, K.R., Murdough, P.A. und Bramley, A.J. (1997) Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* **82**:197-203.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S. und Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:1664-1668.
- McDaniel, T.K. und Kaper, J.B. (1997) A cloned pathogenicity island cloned from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **23**:399-407.
- McKee, M.L. und O'Brien, A.D. (1995) Investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*. *Infect. Immun.* **63**:2070-2074.
- Mekalanos, J.J. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**:1-7.
- Ménard, R., Sansonetti, P.J., Parsot, C. und Vasselon, T. (1994) Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *Shigella flexneri*. *Cell* **79**:515-525.
- Michiels, T. und Cornelis, G.R. (1991) Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *J. Bacteriol.* **173**:1677-1685.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M. und Cornelis, G. (1990) Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect. Immun.* **58**:2840-2849.
- Mikulskis, A.V., Delor, I., Thi, V.H. und Cornelis, G.R. (1994) Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin st gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH, and bacterial host factors. *Mol. Microbiol.* **14**:905-915.
- Miller, V.L. und Mekalanos, J.J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* require *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**:2575-2583.

- MMWR (1993) Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from Hamburgers-Western United States, 1992-1993. *Morb. Mortal Wkly. Rep.* 258-263.
- MMWR (1997) *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers - Colorado, 1997. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 46:777-778.
- Murphy, C.K. und Beckwith, J. (1996) Export of proteins to the cell envelope in *Escherichia coli*. In: Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Riley, M., Reznikoff, W.S., Schaechter, M. und Umberger, H.E. (Ed.) *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2. Aufl. S. 967-978. ASM Press, Washington, D.C.
- Murray, R.G.E. (1981) Morphology: Cell fractionation. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. und Phillips, G.B. (Ed.) *Manual of methods for general bacteriology*. S. 56-61. ASM Press, Washington, D.C.
- Murre, C., McCaw, P.S. und Baltimore, D. (1989a) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins. *Cell* 56: 777-783.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H. und Baltimore, D. (1989b) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.
- Nakai, K. und Kanehisa, M. (1991) Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria. *Proteins* 11:95-110.
- Neter, E. und Westphal, O. (1955) Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics* 16:801-807.
- Neyt, C. und Cornelis, G.R. (1999) Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol. Microbiol.* 31:143-156.
- O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W. und Formal, S.B. (1983) *Escherichia coli* O157-H7 strain associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* 1:702
- O'Brien, A.D., Tesh, V.L., Donohue Rolfe, A., Jackson, M.P., Olsnes, S., Sandvig, K., Lindberg, A.A. und Keusch, G.T. (1992) Shigatoxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 180:65-94.
- O'Brig, T.G., Louise, C.B., Lingwood, C.A., Boyd, B., Barley Maloney, L. und Daniel, T.O. (1993) Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *J. Biol. Chem.* 268: 15484-15488.
- Ochman, H., Soncini, F.C., Solomon, F. und Groisman, E.A. (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7800-7804.
- Oelschlaeger, T.A., Barrett, T.J. und Kopecko, D.J. (1994) Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Infect. Immun.* 62:5142-5150.
- Pallen, M.J., Dougan, G. und Frankel, G. (1997) Coiled-coil domains in proteins secreted by type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* 25:423-425.
- Parsek, M.R., Coco, W.M. und Chakrabarty, A.M. (1994) Gel-shift assay and DNase I footprinting in analysis of transcriptional regulation of biodegradative genes. In: Anonymous *Methods in Molecular Genetics*. S. 273-290. Academic Press]
- Parsot, C. (1994) *Shigella flexneri*: genetics of entry and intracellular dissemination in epithelial cells. *Curr. Top. Microbiol.* 192:217-241.
- Paton, A.W., Manning, P.A., Woodrow, M.C. und Paton, J.C. (1998) Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroups O26,

- O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity. *Infect. Immun.* **66**:5580-5586.
- Pepe, J.C., Badger, J.L. und Miller, V.L. (1994) Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* inv gene. *Mol. Microbiol.* **11**:123-135.
 - Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. und Blattner, F.R. (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **66**:3810-3817.
 - Plano, G.V. und Straley, S.C. (1995) Mutations in yscC, yscD, and yscG prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **177**:3843-3854.
 - Pollock, R. und Treisman, R. (1990) A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res.* **18**:6197-6204.
 - Porter, M.E. und Dorman, C.J. (1994) A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **176**:4187-4191.
 - Power, C.A., McEwen, S.A., Johnson, R.P., Shoukri, M.M., Rahn, K., Griffiths, M.W. und De Grandis, S.A. (1998) Repeatability of the Petrifilm HEC test and agreement with a hydrophobic grid membrane filtration method for the enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 on beef carcasses. *J. Food Prot.* **61**:402-408.
 - Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W. und Schoolnik, G.K. (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* **20**:87-100.
 - Pugsley, A.P. (1993a) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:50-108.
 - Pugsley, A.P. (1993b) Processing and methylation of PulG, a pilin-like component of the general secretory pathway of *Klebsiella oxytoca*. *Mol. Microbiol.* **9**:295-308.
 - Pupo, G.M., Karaolis, D.K.R., Lan, R. und Reeves, P.R. (1997) Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect. Immun.* **65**:2685-2692.
 - Rabinowitz, R.P., Lai, L.C., Jarvis, K., McDaniel, T.K., Kaper, J.B., Stone, K.D. und Donnenberg, M.S. (1996) Attaching and effacing of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli* in the absence of detectable tyrosine kinase mediated signal transduction. *Microb. Pathog.* **21**:157-171.
 - Rao, G.G., Saunders, B.P. und Masterton, R.G. (1996) Laboratory acquired verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) infection [letter]. *J. Hosp. Infect.* **33**:228-230.
 - Rees, J.G., Ades, S.E., Singer, S.J. und Hynes, R.O. (1990) Sequence and domain structure of talin. *Nature* **347**:685-689.
 - Reisbig, R., Olsnes, S. und Eiklid, K. (1981) The cytotoxic activity of *Shigella* toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* **256**:8739-8744.
 - Renwick, S.A., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Lior, H., Borczyk, A., Spika, J.S., Rahn, K., McFadden, K., Brouwer, A. und Copps, A. (1994) Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human - Ontario. *Can. Commun. Dis. Rep.* **20**:73-75.
 - Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. und Cohen, M.L. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**:681-685.
 - Rimsky, S. und Spassky, A. (1990) Sequence determinants for H1 binding on *Escherichia coli* lac and gal promoters. *Biochem.* **29**:3765-3771.
 - RKI (1994) Eine heimliche Seuche: Gift-bildende Darmbakterien können schwerste Nierenschäden auslösen. *Pressemitteilung*

- RKI (1997) EHEC-Infektionen - Erkennung, Verhütung, Bekämpfung. *Bundesgesundhbl.* **6**: 210-211.
- Roine, E., Saarinen, J., Kalkkinen, N. und Romantschuk, M. (1997a) Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reassembles into pili. *FEBS Lett.* **417**:168-172.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. und He, S.Y. (1997b) Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3459-3464.
- Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. und Finlay, B.B. (1992) Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO J.* **11**:3551-3560.
- Rosenshine, I., Duronio, V. und Finlay, B.B. (1992) Tyrosine protein kinase inhibitors block invasion-promoted bacterial uptake by epithelial cells. *Infect. Immun.* **60**:2211-2217.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S. und Finlay, B.B. (1996) Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**:966-973.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Stein, M., Reinscheid, D.J., Mills, S.D. und Finlay, B.B. (1996) A pathogenic bacterium triggers epithelial signal to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J.* **15**:2613-2624.
- Rosqvist, R., Magnusson, K.E. und Wolf Watz, H. (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* **13**:964-972.
- Ruder (1996) Unsichtbare Spur. *Der Spiegel* **20**: 194-195.
- Russel, M. (1994) Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export? *Science* **265**:612-614.
- Ryan, C.A., Nickels, M.K., Hargrett-Bean, N.T., Potter, M.E., Endo, T. und Mayer, L. (1987) Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. *JAMA* **58**:3269-3274.
- Salmond, G.P.C. und Reeves, P.J. (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **18**:7-12.
- Samadpour, M., Ongerth, J.E., Liston, J., Tran, N., Nguyen, D., Whittam, T.S., Wilson, R.A. und Tarr, P.I. (1994) Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1038-1040.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: Cold Harbor Laboratory Press.
- Sanger, J.M., Chang, R., Ashton, F., Kaper, J.B. und Sanger, J.W. (1996) Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **34**: 279-287.
- Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M. und Fasano, A. (1996) Enteraggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteraggregative E. coli. *J. Infect. Dis.* **173**:1019-1022.
- Scheinert, P. (1996) Nucleinsäure blotting-Methoden für DNA und RNA. 8. Ausg., S. 84-87. Marktheidenfeld: Media Tec Verlag.
- Schell, M.A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**:597-626.
- Schesser, K., Frithz Lindsten, E. und Wolf Watz, H. (1996) Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cell membranes. *J. Bacteriol.* **178**:7227-7233.
- Schmidt, H., Beutin, L. und Karch, H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Infect. Immun.* **63**:1055-1061.

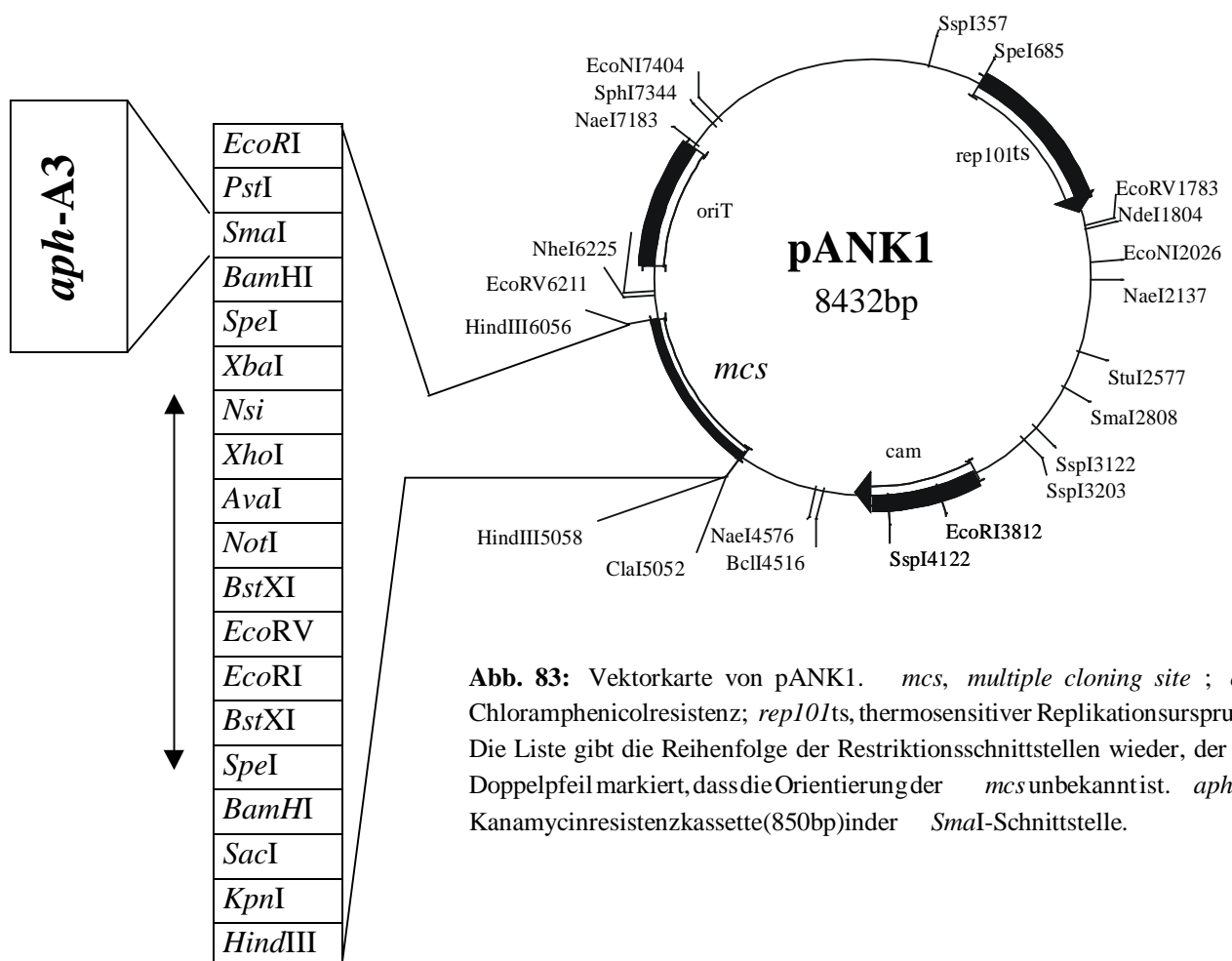
- Schmidt, H., Henkel, B. und Karch, H. (1997) A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**:265-272.
- Schmidt, H. und Karch, H. (1996) Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2364-2367.
- Schoeni, J.L. und Doyle, M.P. (1994) Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2958-2962.
- Schubert (1997) Listerisikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten. *Bundesgesundhbl.* **40**, 3-5.
- Small, P.L.C., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E. und Slonczewski, J.L. (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* **176**:1729-1737.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I. und Cornelis, G.R. (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:11998-12002.
- Sory, M.P. und Cornelis, G.R. (1994) Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.* **14**:583-594.
- Stone, K.D., Zhang, H.Z., Carlson, L.K. und Donnenberg, M.S. (1996) A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol. Microbiol.* **20**:325-337.
- Strockbine, N.A., Marques, L.R., Newland, J.W., Smith, H.W., Holmes, R.K. und O'Brien, A.D. (1986) Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect. Immun.* **53**:135-140.
- Sun, J., Inouye, M. und Inouye, S. (1991) Association of a retron element with a P4-like cryptic prophage (retron phage ϕ -R73) integrated into the *cel* mRNA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:4171-4181.
- Swerdlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippen, S., Donnell, H.D., Jr., Geldreich, E., Payne, B.J., Meyer, A., Jr., Wells, J.G. und et al (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death [see comments]. *Ann. Intern. Med.* **117**:812-819.
- Takeuchi (1967) Electron microscopic studies of experimental *Salmonella* infection I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Pathol.* **52**, 503-529.
- Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A. und Takahashi, H. (1993) Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product σ^{38} is a secondary principal sigma factor of RNA polymerase in stationary phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3511-3515.
- Tanaka, N., Kawakami, T. und Taniguchi, T. (1993) Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol. Cell. Biol.* **13**:4531-4538.
- Tarr, P.I. (1995) *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1-8.
- Taylor, J.L., Tuttle, J., Pramukul, T., O'Brien, K., Barrett, T.J. und Jolbitado, B. (1993) An outbreak of cholera in Maryland associated with imported commercial coconut milk. *J. Infect. Dis.* **167**:1330-1335.
- Taylor, K.A., O'Connell, C.B., Luther, P.W. und Donnenberg, M.S. (1998) The EspB Protein of Enteropathogenic *Escherichia coli* is Targeted to the Cytoplasm of Infected HeLa Cells. *Infect. Immun.* **66**:5501-5507.

- Tesh, V.L., Ramegowda, B. und Samuel, J.E. (1994) Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **62**:5085-5094.
- Tobe, T., Schoolnik, G.K., Sohel, I., Bustamante, V.H. und Puente, J.L. (1996) Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**:963-975.
- Torres, A.G. und Payne, S.M. (1997) Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **23**:825-833.
- Tzipori, S., Gunzer, F., Donnenberg, M.S., de Montigny, L., Kaper, J.B. und Donohue Rolfe, A. (1995) The role of the eaeA gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* **63**:3621-3627.
- Upton, P. und Coia, J.E. (1994) Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* **344**:1015
- van Gijsegem, F., Genin, S. und Boucher, C. (1993) Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.* **1**:175-180.
- Vanmaele, R.P. und Armstrong, G.D. (1997) Effect of carbon source on localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **65**:1408-1413.
- Viret, J.F., Cryz, S.J. und Favre, D. (1996) Expression of Shigella sonnei lipopolysaccharide in vibrio cholerae. *Mol. Microbiol.* **19**:949-963.
- von Moll, L.K. und Cantey, J.R. (1997) Peyer's Patch adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains in rabbits. *Infect. Immun.* **65**:3788-3793.
- Wainwright, L.A. und Kaper, J.B. (1998) EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **27**:1247-1260.
- Wandersman, C. (1996) Secretion across the bacterial outer membrane, S. 955-966. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, M. Riley, S. Reznikoff, M. Schaechter und H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2. Aufl. ASM Press, Washington, D.C.
- Watanabe, H., Wada, A., Inagaki, Y., Itoh, K. und Tamura, K. (1996) Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996 [letter]. *Lancet* **348**:831-832.
- Waterman, S.R. und Small, P.L.C. (1996) Characterization of the acid resistance phenotype and *rpoS* alleles of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **64**:2808-2811.
- Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T. und Cornelis, G.R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:10493-10497.
- Wattiau, P., Woestyn, S. und Cornelis, G.R. (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**:255-262.
- Weagant, S.D., Bryant, J.L. und Bark, D.H. (1994) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J. Food Protect.* **57**:629-631.
- Weaver, J.W. und Rowe, M.T. (1997) Effect of non-target cells on the sensitivity of the PCR for *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**:109-112.
- Wells, J., Davis, B.R. und Wachsmuth, I.K. (1983) Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Invest.* **18**:512-520.
- WHO (1996a) *Escherichia coli* O157:H7. *Fact Sheet* N125.
- WHO (1996b) The World Health Report 1996: fighting disease, fostering development. World Health Organization, Genf.
- WHO (1996c) *Weekly Epid. Report* **35**.
- WHO (1997a) Foodborne diseases - possibly 350 times more frequent than reported. *Press Rel.* WHO/58.

- WHO(1997b) *E.coli* infections appear to be increasing, expert essay. *PressRel.* WHO/41.
- Wieler, L.H., McDaniel, T.K., Whittam, T.S. und Kaper, J.B. (1997) Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**:49-53.
- Wieler, L.H., Vieler, E., Erpenstein, C., Schlapp, T., Steinruck, H., Bauerfeind, R., Byomi, A. und Baljer, G. (1996) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2980-2984.
- Williams, A.W. und Straley, S.C. (1998) YopD of *Yersinia pestis* plays a role in negative regulation of the low-calcium response in addition to its role in translocation. *J. Bacteriol.* **180**:350-358.
- Willshaw, G.A., Smith, H.R., Scotland, S.M. und Rowe, B. (1985) Cloning of genes determining the production of Vero cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:3047-3053.
- Woestyn, S., Sory, M.P., Boland, A., Lequenne, O. und Cornelis, G.R. (1996) The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol. Microbiol.* **20**:1261-1271.
- Wolf, M.K. und Boedeker, E.C. (1990) Cloning of the genes for AF/R1 pili from rabbit enteroadherent *Escherichia coli* RDEC-1 and DNA sequence of the major structural subunit. *Infect. Immun.* **58**:1124-1128.
- Wolff, C., Nisan, I., Hanski, E., Frankel, G. und Rosenshine, I. (1998) Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28**:143-155.
- Wood, M.W., Rosqvist, R., Mullan, P.B., Edwards, M.H. und Galyov, E.E. (1996) SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol. Microbiol.* **22**:327-338.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**:3469-3478.
- Worley, K.C., Wiese, B.A. und Smith, R.F. (1995) BEAUTY: An enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. *Gen. Res.* **5**:173-184.
- Yu, J. und Kaper, J.B. (1992) Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **6**:411-417.
- Zhao, T. und Doyle, M.P. (1994) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J. Food Protect.* **57**:780-783.

Modifikation von pMAK700oriT

Um die Notwendigkeit der einzelnen gefundenen ORFs innerhalb des IR_{EDL933} für die Pathogenität von EHEC EDL933 zu bestimmen, sollten genau festgelegte *in-frame* Deletionsmutanten erstellt werden. Zunächst wurde versucht, Konstrukte mit dem Suicide-Vektor pKNG101 (Kaniga et al. 1991) in EHEC EDL933 zu bringen. Da sich jedoch Probleme mit der Selektion auf Sucrose ergaben, wurde der thermosensitive Suicide-Vektor pMAK700oriT verwendet (Viret et al. 1996). Dieser Vektor hat den entscheidenden Vorteil, dass rekombinante Klone zunächst als extrachromosomales Konstrukt vorliegen, und erst im weiteren Vorgehen auf die Integration des Vektors selektiert wird. Somit muss bei der Transformation oder Konjugation lediglich auf den bei EHEC EDL933 oft schwierig erzielbaren Transfer der DNA (Donnenberg et al. 1993a) selektiert werden. pMAK700oriT enthält jedoch nur wenige singuläre Restriktionsschnittstellen, die für eine Klonierung in Frage kommen. Zudem lagen bereits einige Deletionsfragmente in pCR2.1 kloniert vor. Für diese und künftige Fragmente wurde in pMAK700oriT eine *multiple cloning site* (*mcs*) mit einer *aph-A3*-Kanamycinresistenzkassette eingebracht und hierdurch pANK1 konstruiert.



Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μ	mikro, 10^{-6}
A	Ampère
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
acc.no.	Erkennungsnummer in der Datenbank
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CFU	colony forming units
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	di-Desoxynukleosidtriphosphat
ddUTP	di-Desoxyuridintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithioerythritol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
etal.	et aliter
etc	<i>etcetera</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
Gen	Gentamycin
h	Stunde
H ₂ O _M	MilliQ-Wasser
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-D-thiogalaktopyranosid
k	kilo, 10^3
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Bertani

M	molar
m	milli, 10^{-3}
m	Meter
MCS	multiplecloningsite
min	Minuten
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
n	nano, 10^{-9}
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitro-BlauTetrazoliumSalz
OD	OptischeDichte
p	pico, 10^{-12}
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferteSaline
PCR	PolymeraseChainReaction
pI	IsoelektrischerPunkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	UmdrehungenproMinute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferteSaline
Tc	Tetracyclin
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
u.U.	unterUmständen
V	Volt
v/v	volumepervolume
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	weightpervolume
xg	VielfachesderErdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid
z.T.	zumTeil
z.Z.	zurZeit

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:TodesursachenundAufteilungderInfektionskrankheitenweltweit	1
Abb.2:TodesfäledurchInfektionskrankheiten–die10häufigstenUrsachen.....	2
Abb.3:SchematischerÜberblickderSekretionssystemeI,IIundIII.....	17
Abb.4:4-StufenmodellderAdhäsionvonEPECaInEpithelzellen.....	19
Abb.5:Aufbaudesdownward-Kapillar-Transfers.....	64
Abb.6:InfektionvonEHECEDL933aufHeLa-ZellenundPedestal-Bildung.....	69
Abb.7:InvasionvonEHECEDL933inHeLa-Zellen	71
Abb.8:MechanismenderInvasionvonEHECEDL933.....	72
Abb.9:EinflussvonFCSaufdieInvasionvonEHECEDL933.	73
Abb.10:AnalysekonserverterBereicheinEspB.....	76
Abb.11:ÜberexpressionvonEspB _{EDL933}	78
Abb.12:PCR-AmplifikationvonIR _{EDL933}	79
Abb.13:NukleotidsequenzundORF-Karte vonIR _{EDL933}	83
Abb.14:Konservierung eines <i>coiled-coil</i> Motivs in <i>espA</i> _{EDL933}	86
Abb.15:Schematische Darstellung der Deletion von <i>espA</i> _{EDL933}	87
Abb.16:Sekretions-undExpressionsmustervonEHECEDL933 $\Delta espA$	88
Abb.17:AdhäsionundInvasionvonEHECEDL933 $\Delta espA$	89
Abb.18:Immunfluoreszenzmikroskopische Analyseder Adhärenz vonEHECEDL933 $\Delta espA$..	90
Abb.19:EDL933 $\Delta espA$ aufHeLa-Zellen.....	90
Abb.20:InfektionvonHeLa-ZellenmitEHECEDL933 $\Delta espA$	91
Abb.21:Rasterelektronenmikroskopische Analyseder <i>surface appendages</i> vonEHECEDL933	94
Abb.22:Elektronenmikroskopische Analyse vonEHECEDL933 $\Delta espA$	94
Abb.23:NachweisderBeteiligungvonEspA _{EDL933} anderBildungvon <i>surface appendages</i> ...	95
Abb.24:NachweisdesBakterien-Zell-KontaktesüberEspA-FilamentemittelsvertikalerSektion	96
Abb.25:DetektionvonEspAenthaltendenmakromolekularenStrukturenaufSTEC413.89-1 mitHilfeder <i>on-grid</i> -Immunelektronenmikroskopie	98
Abb.26:DetektionvonEspA-FilamentenaufSTEC413.89-1mitHilfederIFESEM.....	100
Abb.27:DetektionvonEspA-FilamentenaufEHECEDL933mitHilfederIFESEM.....	100
Abb.28:SchematischeDarstellungderDeletionvon <i>espD</i> _{EDL933}	102
Abb.29:SchematischeDarstellungderKomplementationvonEHECEDL933 $\Delta espD$	103
Abb.30:Sekretions-undExpressionsmustervonEHECEDL933 $\Delta espD$	103
Abb.31:SekretionvonEspA _{EDL933} undEspB _{EDL933} durchEHECEDL933 $\Delta espD$	104
Abb.32:AdhäsionundInvasionvonEHECEDL933 $\Delta espD$	105
Abb.33:Immunfluoreszenzmikroskopische Analyseder Adhärenz vonEHECEDL933 $\Delta espD$	106
Abb.34:SedimentationvonEHECEDL933 $\Delta espD$	107
Abb.35:BildungeinesPräzipitatesdurchEHECEDL933 $\Delta espD$	107
Abb.36:InfektionvonHeLa-ZellenmitEHECEDL933 $\Delta espD$	108

Abb.37: Bildung von Zellaggregaten von EHEC EDL933 $\Delta espD$	108
Abb.38: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Bildung von EspA-Filamenten durch EHEC EDL933 $\Delta espD$	109
Abb.39: Zellaggregate von EHEC EDL933 $\Delta espD$ auf HeLa-Zellen	110
Abb.40: Infektion von J774-A1 mit EHEC EDL933 $\Delta espD$	111
Abb.41: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von EspD EDL933 während einer Infektion von EHEC EDL933 an HeLa-Zellen	112
Abb.42: Fraktionierung infizierter HeLa-Zellen	114
Abb.43: Konservierung von SepLin pathogenen <i>E. coli</i>	115
Abb.44: Computeranalytische Daten von SepL EDL933	117
Abb.45: Schematische Darstellung der Deletion von <i>sepL</i> EDL933	118
Abb.46: Schematische Darstellung der Komplementation von EHEC EDL933 $\Delta sepL$	119
Abb.47: Sekretions- und Expressionsmuster von EHEC EDL933 $\Delta sepL$	119
Abb.48: Sekretion von P54 EDL933 durch EHEC EDL933 $\Delta sepL$	120
Abb.49: N-terminale Bestimmung von P54 EDL933	120
Abb.50: Veränderte Sekretion von EspE EDL933 durch EHEC EDL933 $\Delta sepL$	121
Abb.51: Adhäsion von EHEC EDL933 $\Delta sepL$	122
Abb.52: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Adhärenz von EHEC EDL933 $\Delta sepL$	123
Abb.53: Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Adhärenz von EHEC EDL933 Δ	124
Abb.54: Überexpression von SepL EDL933	125
Abb.55: Lokalisation von SepL EDL933	126
Abb.56: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von SepL EDL933 und EspA	127
Abb.57: Bindung von SepL EDL933 an Proteine aus EHEC EDL933	128
Abb.58: Hydrophobizitätsplots für Pas EDL933 und die Pashomologen Proteine YscD und PscD	131
Abb.59: Vergleich zwischen Pas EDL933 und bakteriellen Permeasen	132
Abb.60: Schematische Darstellung der Deletion von <i>pas</i> EDL933	133
Abb.61: Sekretion von EspE in EHEC EDL933 Δpas	133
Abb.62: Adhäsion und Invasion von EHEC EDL933 Δpas	134
Abb.63: Elektronenmikroskopische Analyse von Adhäsion und Invasion von EHEC EDL933 Δpas	135
Abb.64: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Adhärenz von EHEC EDL933 Δpas	137
Abb.65: Überexpression und Aufreinigung des His ⁻ -Pas EDL933 Fusionsproduktes	138
Abb.66: Subzelluläre Lokalisation des Pas EDL933 Proteins	139
Abb.67: Bindung von Pas EDL933 an sekretierte Proteine aus EHEC EDL933	141
Abb.68: Überexpression und Aufreinigung des His ⁻ -EspA EDL933 Fusionsproduktes	143
Abb.69: Bestimmung der Kopplungseffizienz auf gereinigter Proteine an Latex Beads	143
Abb.70: Schematische Darstellung der durch PCR-Amplifikation generierten DNA-Sonden	145
Abb.71: Northern Blot Analyse des <i>espA</i> EDL933, <i>espD</i> EDL933 und <i>espB</i> EDL933 enthaltenden mRNA Transkripts	146

Abb.72:PCR-Produkteausdemfür <i>espA</i> _{EDL933} , <i>espD</i> _{EDL933} und <i>espB</i> _{EDL933} spezifischen 5'- RACEExperiment	147
Abb.73:IdentifizierungdesTranskriptionsstartesdes <i>esp</i> -OperonsdurchPrimerExtension Analyse	148
Abb.74:Promotorbereichdes <i>esp</i> -Operons	148
Abb.75:Expressionder β -GalaktosidasedurchEHECEDL933(pUJ3)beiInfektionvonHeLa- Zellen	149
Abb.76:Induktionder β -GalaktosidasedurchverschiedeneMedien	150
Abb.77:Induktionder β -GalaktosidasedurchverschiedeneSpurenelemente	151
Abb.78:Aktivierungdes <i>esp</i> -OperonsinReaktionaufÄnderungenvonTemperaturund Osmolarität.....	152
Abb.79:AbhängigkeitderTranskriptiondes <i>esp</i> -Operonsvon σ^S undH-NS	153
Abb.80:AbhängigkeitderTranskriptiondes <i>esp</i> -OperonsvomMegaplasmid	153
Abb.81:SchematischeDarstellungeinerputativenHomodimerisierungvonSepL _{EDL933}	164
Abb.82:4-StufenmodellderAdhäsionvonEHEC an Epithelzellen	175

Abbildungsverzeichnis

Tab.1: Verwendete Bakterienstämme	23
Tab.2: Plasmide	24
Tab.3: Verwendete eukaryontische Zelllinien	25
Tab.4: Chemikalien	25
Tab.5: Membranen	27
Tab.6: Enzyme	27
Tab.7: Kits	28
Tab.8: Verwendete kommerziellerwerbliche Antikörper und Seren	28
Tab.9: Verwendete nicht-kommerziellerwerbliche Antikörper und Seren	29
Tab.10: Oligonukleotide	29
Tab.11: Verwendete Selektionsmarker	32
Tab.12: Koloniefärbung auf Sorbitol-MacConkey (SMAC)-Agar und Rainbow-Agar™	35
Tab.13: Nützliche <i>links</i> im World Wide Web (WWW)	67
Tab.14: Bedingungen für die Amplifikation von IR _{EDL933} durch PCR mit dem EHF-PCR-Kit ..	79
Tab.15: Homologien zu Gen-Produkten der IR _{EDL933} -Sequenz	83
Tab.16: Verwendete Primer für 5'-RACE	146

DANKSAGUNG

Danksagungen

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Impfstoffforschung der Abteilung Medizinische Mikrobiologie, Bereich Mikrobiologie der GBF Braunschweig durchgeführt.

Meinem Mentor, Herrn Prof. Dr. Kenneth N. Timmis, danke ich für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit auf einem sehr interessanten und aktuellen Zweig der Medizinischen Mikrobiologie. Ferner bin ich dankbar für die Übernahme des Referates, des Prüfers in der Disputation und für die anregenden Diskussionen innerhalb der Montagsseminare.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland danke ich für die Übernahme des Koreferates und des Amtes des Prüfers in der Disputation.

Herrn Prof. Dr. Norbert Käufer schulde ich Dank für die Beteiligung an der Prüfungskommission.

Die wissenschaftliche Betreuung dieser Doktorarbeit wurde von Herrn Dr. Carlos A. Guzmán durchgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank für eine immerwährende Unterstützung meines wissenschaftlichen Arbeitens, für die Einführung in die Materie wissenschaftlichen Publizierens und für viele fruchtbare und motivierende Diskussionen. Seine fürsorgliche Kollegialität hat das Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe sehr angenehm gestaltet.

Herrn Dr. Beltrametti danke ich für eine sehr freundliche und sehr erfolgreiche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Regulation.

Herrn Dipl.-Biol. Kai Schulze danke ich für das Pfeifen und Singen im Labor. Es hat mir viel Spaß gemacht, seine Diplomarbeit zu begleiten und gemeinsam gegen die Tücken von EHEC EDL933 vorzugehen.

Großen Dank schulde ich Herrn Dr. Frank Ebel, Justus-Liebig-Universität zu Giessen, für viele fachkundige und hilfreiche Einblicke und Diskussionen. Mit diesen und der Bereitstellung wichtiger Arbeitsmaterialien war es mir möglich, neuartige Aspekte der Pathogenität von EHEC aufzudecken.

Herrn Dr. Manfred Rohde und Frau Ellruth Müller danke ich für die vielen wundervollen elektronenmikroskopischen Fotos, die wesentlich zur Aufklärung der Virulenzfaktoren beitrugen. Zudem bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe EM für die herzerfrischend lustige Zeit.

Vielen Dank an Frau Dr. Mahtab Nourbakhsh für die sehr freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei den DNA-Bindungsstudien, und danke sehr Frau Annette Krüger und Herrn Carsten Stroempl für die vielen Sequenzierungen.

Frau Dr. Eva Medina danke ich für die Durchführung von Immunisierungen und fachkundige Diskussionen über das menschliche Immunsystem.

Bei Frau Astrid Müller und Frau Bianka Karge bedanke ich mich für das nette Laborleben und für ihre Hilfestellungen. In diesem Sinne geht auch mein Dank an die ehemaligen Mitglieder dieser Gruppe Holger Basso, Ute Jakubzik, Barbara Tzschaschel, Silke Klee und Lothar Ständner. Eine erfrischende Bereicherung erbrachte der Zugang durch Frau Antonia Toppel (ATO), die durch ihre Lebenslust gut in die Arbeitsgruppe passte.

Mein Dank gilt im Besonderen meinen Eltern: vielen Dank für das Studium der Biologie!

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Frau Inga Kresse für die sorgsame Überführung dieser Arbeit in eine aktuelle Form gemäß der neuen Rechtschreibung und meinem Sohn Melvin für die wunderbare Abwechslung vom wissenschaftlichen Leben.

Melvin: ich wünsche dir, dass du stets gesund und glücklich bleiben kannst!